

ENZYMATISCHE UNTERSUCHUNGEN
ZUR SCHÄDIGUNG VON KRYOSPERMA

Dr. med. vet. Rainer Hoffmann

1970
—

Dissertations- und Fotodruck ANNELIESE SCHUBERT
Corneliusstraße 21 • 8000 München 5 • Telefon 268177

Aus der Dermatologischen Klinik und Poliklinik
der Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Otto Braun-Falco

ENZYMATISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR SCHÄDIGUNG VON
KRYOSPERMA

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Dr. med. vet. Rainer Hoffmann
aus
Riesa/Elbe
1978

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität
München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Dr. med. habil.
Wolf-Bernhard Schill

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Otto Braun-Falco

Dekan: Prof. Dr. med. Wolfgang Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 31. Juli 1978



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. EINLEITUNG	1
B. SCHRIFTTUM	2
1. Historische Entwicklung der Spermaforschung	2
2. Kryospermaforschung	5
2.1 Entwicklung und Methoden	5
2.2 Erfolge und Ausblicke der Kryospermaforschung	8
3. Biochemie des Samens	12
3.1 Entwicklung und derzeitiger Stand der biochemischen Erforschung des Samens	12
3.2 Untersuchte Enzyme	15
3.2.1 "Chymotrypsin-ähnliches Enzym" (CHY)	15
3.2.2 Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT)	16
3.2.3 Lactat-Dehydrogenase (LDH)	18
3.2.4 Alkalische und Saure Phosphatase (AP und SP)	20
3.3 Biochemie des Kryospermas	21
C. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	24
I. Material und Methoden	24
1. Untersuchungsmaterial	24
2. Vorbereitung der Proben zur biochemischen Untersuchung	24
3. Kryospermakonservierung	24
4. Photometrische Messungen	26
5. Biochemische Methodik	26
5.1 Analyse des "Chymotrypsin-ähnlichen Enzyms" (CHY)	26
5.2 Analyse der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT)	27
5.3 Analyse der Lactat-Dehydrogenase (LDH)	28
5.4 Analyse der Alkalischen Phosphatase (AP)	28
5.5 Analyse der Sauren Phosphatase (SP)	29
6. Präzisionskontrollen	30
7. Statistische Auswertungen	30

	Seite
II. Ergebnisse	31
1. Biochemische Spermauntersuchungen vor und nach Kältebehandlung	31
1.1 "Chymotrypsin-ähnliches Enzym" (CHY)	31
1.2 Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT)	44
1.3 Lactat-Dehydrogenase (LDH)	56
1.4 Alkalische Phosphatase (AP)	68
1.5 Saure Phosphatase (SP)	74
D. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE	80
E. ZUSAMMENFASSUNG	89
F. LITERATURVERZEICHNIS	93

A. EINLEITUNG

Die Konservierung von Humansperma gewinnt in zunehmendem Maße an Bedeutung. Nach den Erfolgen der Veterinärmedizin auf dem Gebiete der tierischen Reproduktion durch Einführung der künstlichen Insemination mit Kryosperma ist nun auch die Humanmedizin in der Lage, durch geeignete Tiefgefrierverfahren Sperma zu lagern, um es zu einem späteren Zeitpunkt für therapeutische und wissenschaftliche Zwecke zu verwenden. Damit ist ein alter Wunschtraum der Menschheit erfüllt, zu einem beliebigen Zeitpunkt eine Befruchtung mit anschließender Schwangerschaft zu ermöglichen.

In diesem Zusammenhang ist es von Interesse, inwieweit die Spermatozoen durch das Einfrieren bei extremen Temperaturen geschädigt werden. Aufschluß hierüber können uns morphologische und biochemische Untersuchungen der Ejakulate vor und nach der Kryobehandlung geben. Insbesondere die Biochemie des Seminalplasmas ist dazu geeignet.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit ist die biochemische Spermauntersuchung vor und nach Kryokonservierung. Es soll versucht werden, eine etwaige Schädigung der Spermatozoen durch das Tiefgefrieren anhand des Enzymmusters von 5 Fermenten aufzuzeigen.

B. SCHRIFTTUM

1. Historische Entwicklung der Spermaforschung

Schon immer hat den Menschen das Fruchtbarkeitsgeschehen interessiert. Insbesondere die Frage der Unfruchtbarkeit bewegte ihn. Über das rein Spekulative hinausgehende Untersuchungen waren erst nach der Erfindung des Mikroskops durch LEEUWENHOEK (1677) möglich. Von diesem Zeitpunkt an beschäftigte sich eine Vielzahl von Wissenschaftlern mit der Erforschung des Spermas. Einen guten Überblick über die historische Entwicklung dieses Forschungszweiges geben die Bücher von JOEL (47) und von HEINKE und DOEPFNER (40).

Das Verdienst erstmals Spermatozoen gesehen zu haben, gebührt dem Holländer HAM (1677). Als Zeitgenosse LEEUWENHOEK's inspirierte er diesen zu weitergehenden Studien. Letzterer machte ausgedehnte Untersuchungen zur Morphologie, Physiologie und Pathologie des Samens, worüber er in 150 Briefen der Royal Society in London berichtete. Er erkannte im Fehlen von "Samentierchen" im Sperma die Ursache für die männliche Sterilität. Bei einem älteren Mann, bei dem er keine Spermatozoen im Ejakulat fand, schloß er, daß dieser "ein ausgedienter Soldat im Liebeskampf" sei. Von da an bis in die Mitte des 19. Jahrhunderts bestand dann die Ansicht, daß die Spermatozoen selbständige Lebewesen seien (39).

Von GLEICHEN-RUSSWORM (1717-1783), der Befruchtungsversuche an Haustieren unternahm, brachte das Fehlen von Spermatozoen mit der Ehesterilität in Zusammenhang. Er glaubte, daß bei unfruchtbaren Ehen das Mikroskop den Streit zwischen den Ehepartnern schlichten könne (28).

Gegen Ende des 18. Jahrhunderts berichtete HALLER in seinen enzyklopädistischen Darstellungen über die Sperma-

probleme bei Mensch und allen Tierklassen. Wichtig erscheint seine Aussage, daß Samenfäden bei allen Tieren der hohen und niederen Klassen vorkommen (39).

Befruchtungsversuche vorwiegend an Amphibien unternahm SPALLANZANI (1729-1799). Nach seiner Auffassung war eine Konzeption nicht unbedingt vom Vorhandensein von Spermatozoen abhängig. Trotz dieser falschen Schlußfolgerung gilt er als der erste Physiologe, der systematisch und exakt die Probleme der Befruchtung und die Beteiligung des männlichen Partners an diesem Vorgang untersucht hat (39).

Einen ersten Versuch zur homologen artefiziellen Insemination beim Menschen machte HUNTER (1728-1793). Von einem Ehemann, der durch eine Mißbildung des äußeren Genitale nicht in der Lage war zu kohabitieren, ließ er durch Masturbation Sperma gewinnen, das er in die Scheide der Frau einführte. Es soll zu einer Schwangerschaft gekommen sein (28).

Eine neue Ära in der Spermaforschung begann mit KÖLLIKER, der 1841 eine Monographie herausgab, in der er eigene und fremde Beobachtungen über Entwicklung und Wesen der Spermatozoen zusammenfaßte. Bestand bis dahin die Theorie von den "Samentierchen" als selbständigen Lebewesen, so betrachtete er die Spermatozoen als "der Idee des tierischen Organismus untergeordnete Elementarteile des Organismus". Der Kern seiner Aussagen war, daß die Spermatozoen wie jede andere Zelle des tierischen Organismus aus Zellen entstanden (39).

In der Folgezeit wurden durch histologische Untersuchungen die Vorgänge der Zellvermehrung und -differenzierung der Spermiogenese aufgedeckt. Von LEYDIG (1821-1908) entdeckte 1850 die nach ihm benannten Zwischenzellen des Hodens.

Der Tierarzt SERTOLI (1835-1910) beschrieb die "vegetativen" Hodenzellen, über deren Bedeutung lange diskutiert wurde (39). Durch die Weiterentwicklung der Mikroskopiertechnik und die Anwendung geeigneter Färbemethoden in der Histologie war es möglich, die Morphologie und Genese der Spermatozoen zu erforschen.

Viele Spermatologen versuchten morphologische Befunde in Beziehung zum Fertilitätsgeschehen, insbesondere pathologischen Zuständen, zu setzen. Durch LODE (1891) wurde erstmals ein Normalwert eingeführt. Er bestimmte die Spermatozoendichte mit Hilfe einer Erythrozyten-Zählkammer. Sein gefundener Normalwert von 61 Millionen Spermatozoen pro mm^3 hatte bis in die jüngste Zeit seine Gültigkeit (28).

Die Spermaforschung des 20. Jahrhunderts beschäftigt sich weiterhin mit der Morphologie des Spermas insbesondere der Spermiogenese und der Pathomorphologie der Spermatozoenformen. Erkenntnisse der Chemie inspirieren später auch Spermatologen zu ausgedehnten chemisch-biochemischen Forschungen am Sperma. Die Ergebnisse dieser Studien versuchte man mit der Fertilitätsdiagnostik in Einklang zu bringen.

2. Kryospermaforschung

2.1 Entwicklung und Methoden

Im Rahmen der Andrologie gewinnt die Kryospermakonservierung immer mehr an Bedeutung. Mit ihrer Hilfe soll Sperma möglichst schonend ohne erheblichen Qualitätsverlust eingefroren und über einen längeren Zeitraum gelagert werden. Zu einem geeigneten Zeitpunkt wird das Kryosperma dann wieder aufgetaut und zur Erzielung einer normalen Konzeption inseminiert.

Erste Untersuchungen in dieser Richtung dürfte vermutlich 1776 SPALLANZANI durchgeführt haben. Er beobachtete eine Abnahme der Spermatozoenbeweglichkeit unter Kälteeinwirkung bis hin zur Bewegungslosigkeit und eine Wiederbelebung nach Erwärmen (110).

Ebenfalls früh, bereits 1866, machte MANTEGAZZA physiologische Studien an menschlichen Spermatozoen, die er Temperaturen bis -15°C aussetzte. Er gilt als der Schöpfer der Idee zur Errichtung von Samenbanken, die er vornehmlich in der landwirtschaftlichen Nutztviehproduktion einsetzen wollte. Er stellte aber auch die Überlegung an, daß man den Samen von Soldaten aufbewahren könnte, um ihn im Falle ihres Todes zur Erzeugung legaler Nachkommen heranziehen zu können (66).

Erst das Jahr 1938 brachte weitere experimentelle Ergebnisse auf dem Gebiet der Kryospermaforschung. JAHNEL beobachtete nach dem Auftauen von Samen, den er bei -79°C , -196°C und bei -269°C eingefroren hatte, noch lebende Spermatozoen. Er vermutete, daß die Einfriergeschwindigkeit einen Einfluß auf die Überlebensrate der Spermatozoen haben könnte (46).

1940 entdeckte SHETTLES die unterschiedliche Widerstandsfähigkeit der Spermatozoen gegenüber tiefen Temperaturen. Er bestätigte die Theorie JAHNEL's von der Einfriergeschwindigkeit (108).

HOAGLAND und PINCUS stellten 1942 fest, daß menschliche Spermatozoen dann eine maximale Überlebensrate zeigten, wenn sie in flüssigem Stickstoff eingefroren wurden. Sie fanden auch, daß menschliche Spermatozoen im Vergleich zu einigen tierischen eine größere Resistenz gegenüber Kältebehandlung aufweisen (41).

1949 entdeckten POLGE, SMITH und PARKES das Glycerin als Kryoprotektivum (77). Mit dieser Entdeckung wurde der Grundstein für alle tierischen und menschlichen Samenbanken gelegt. Nach 1949 wurden besonders in der Veterinärmedizin ständig neue Kryotechniken entwickelt. Die wichtigsten Erkenntnisse verdanken wir Forschern wie DEMINATUS (1959); FORGASON et al. (1961); HERMAN und MADDEN (1963); MANN (1964); ROHLOFF (1967); SCHMIDT (1968); WALES und O'SHEA (1968) und LIGHTFORT und SALAMON (1970) (16,25,64).

SHERMAN et al. benutzten 1953 Kohlendioxyd als Gefriermedium für Temperaturen bis -79°C . Nach 3 Monaten Lagerung beobachtete er eine Überlebensrate von 67 % (105). Besondere Beachtung verdient der Befund von BUNGE und SHERMAN (1953), die bewiesen, daß tiefgefrorene Spermatozoen in der Lage waren, Eizellen zu befruchten und eine normale embryonale Entwicklung zu induzieren (13).

In Iowa City wurde 1954 die erste Samenbank eröffnet, kurz darauf eine zweite in Tokio. Über erste klinische Erfolge berichteten 1954 BUNGE et al. und SHERMAN (12,99). Bis 1959 überblickt man 20 normale Geburten nach artefizieller Insemination mit Kryosperma (12,43,50,84).

1962 führte SHERMAN flüssigen Stickstoff für die Spermakonservierung ein. Auch bei längerer Lagerung stellte er keine meßbaren Motilitätsverluste der Spermatozoen fest (100). Im darauffolgenden Jahr konnte er über erste Erfolge mit dieser Technik berichten (101). Unter anderem konnte er feststellen, daß die Einfriergeschwindigkeit einen großen Einfluß auf die Überlebensrate der Sperma-

tozoen hat. Je langsamer im Bereich des sogenannten Temperaturschocks ($+25^{\circ}\text{C}$ und $+5^{\circ}\text{C}$) eingefroren wird, desto größer die Überlebensrate. Er widerlegte damit eine 1952 von LUYET aufgestellte Theorie, die das Gegenteil beweist (102). Dieses Ergebnis wurde 1964 durch MANN bestätigt, der feststellte, daß bei zu schneller Abkühlung oberhalb 0°C eine irreversible Schädigung der Zelloberfläche eintritt (64). Die Methode des langsamen Einfrierens, das sogenannte "Slow-freezing-Verfahren", wurde 1967 von SAWADA et al. (85) eingeführt. Dieses Verfahren erwies sich als optimal in Bezug auf die Überlebensrate und den Sauerstoffverbrauch der kryokonservierten Spermatozoen. Im Gegensatz dazu empfahl TYLER die Methode des "Rapid-freezing" (117). Variationen zwischen den beiden Verfahren werden beschrieben. (109).

Wie bereits erwähnt (41), sind menschliche Spermatozoen im Gegensatz zu tierischen gegenüber Temperaturschock und tiefen Temperaturen unempfindlicher. Trotzdem ist bei allen kryobiologischen Konservierungsverfahren mit einer im Vergleich zum Nativsperma geringeren Qualität nach dem Tiefgefrier-Auftau-Vorgang zu rechnen. Es können zum Teil erhebliche Vitalitätsverluste beobachtet werden. Dies kann anhand der Überlebensrate (Sekundärmotilität) und durch die Lebend-Tot-Färbeeigenschaften aufgezeigt werden. Die Sekundärmotilität liegt bei 45 bis 95 % mit einem Durchschnittswert von etwa 70 % (5,76). Bei der von BLOM beschriebenen Eosin-Nigrosin-Methode nehmen die im Bereich des Akrosoms geschädigten Spermatozoen den Farbstoff Eosin auf, sie färben sich, während die unverletzten, lebenden Spermatozoen ungefärbt erscheinen (10,95). Nach SCHILL (86) sollen folgende Faktoren die Überlebensrate kryokonservierter Spermatozoen begünstigen:

1. Zusatz von Glycerin in einer Endkonzentration von 5 - 10 %.
2. Geeignete Puffer- und Nährmedien.

3. Zusatz von 10 % Eidotter.
4. Sperma verdünnung bis maximal 1:5.
5. Intervall zwischen Ejakulation und Kryobehandlung nicht länger als 4 Stunden.
6. Abkühlrate oberhalb und unterhalb des Gefrierpunktes.

Besonders das Glycerin erweist sich als essentiell in der Kryospermakonservierung. Es wirkt als Puffer, bindet Wasser, verhindert die Eiweißdenaturierung und weitgehend die intra- und extrazelluläre Eiskristallbildung (64,100,102).

2.2 Erfolge und Ausblicke der Kryospermeforschung

Es ist sehr schwierig, in der humanmedizinischen Literatur Zahlenmaterial über therapeutische Erfolge mit der Kryospermatechnik zu erhalten. Man vermutet, daß jährlich Tausende von Spenderinseminationen durchgeführt werden. Angaben in der Literatur hierüber sind kaum zu finden. Juristische, politische, ethische, religiöse und auch merkantile Gesichtspunkte mögen hierfür verantwortlich sein. Besonders die heterologe Insemination ist mit moralischen und rechtlichen Tabus behaftet. Noch der 62. Deutsche Ärztetag lehnte sie 1959 aus sittlichen Gründen als wider die Ordnung der Ehe verstoßend ab. Inzwischen wurde durch die gleiche Institution dieser Beschluß zurückgezogen (1970). Die Zahl der im Jahre 1968 nach heterologer Insemination in Deutschland geborenen Kinder wird auf ca. 1000 geschätzt, während die Zahl der durch Donorinsemination gezeugten Kinder in den USA auf 20000, in England auf 3000 und in Frankreich auf 2000 geschätzt wird (86). Wie bereits erwähnt überblickte man bis 1959 zwanzig normale Geburten nach Kryospermmainsemination (12,43,50,84).

1963 erzielt SHERMAN nach Einführung des flüssigen Stickstoffs in die Kryospermakonservierung normale

Konzeptionen und Geburten (101). Andere Autoren folgten (22,76). 1966 berichteten BEHRMAN und SAWADA über 12 Geburten bei 28 Patientinnen nach Kryospermainsemination, das entspricht einer Konzeptionsrate von 43 % (6). Ähnliche Ergebnisse zeigten BEHRMAN et al. (5) 1969 und MATHESON et al. (67). (s. auch Tabelle 1).

TYLER berichtete 1971 über 122 Patientinnen, die mit Donorkryosperma inseminiert worden waren. Bei 86 von ihnen kam es zu einer Gravidität, dies entsprach einer Erfolgsrate von ca. 70 % (117). 1973 überschaute der gleiche Autor 137 Geburten (118). Über die Geburt von 564 normalen, 7 abnormalen Kindern und über 50 spontane Aborte nach Kryospermainseminationen berichtete 1973 SHERMAN (104).

Die Anwendungsmöglichkeiten der Kryospermakonservierung sind in erster Linie auf dem Gebiet der Sterilitätsbehandlung zu sehen. Als Indikationen für die Spermakonservierung bieten sich an:

1. Prophylaktische Konservierung von Sperma bei drohender Fertilitätsstörung durch Entzündungen, Tumoren oder bei vorgesehener Röntgen- und Cytostatikatherapie; bei gefährdeten Berufen; theoretisch bei nuklearen Katastrophen; vor Sterilisation des Ehemannes.
2. Sammeln von Sperma bei Oligospermien.
3. Familienplanung bei Eheleuten, die örtlich getrennt leben müssen und bei Kinderwunsch zum optimalen Befruchtungstermin nicht kohabitieren können.
4. Konservierung von Spendersperma zur heterologen Insemination, wobei neben der androgenen Sterilität Rhesus-Sensibilisierung der Ehefrau und die immunologische Sterilität eine Rolle spielen.
5. Bevölkerungskontrolle und Eugenik, wobei darunter die Erleichterung der freiwilligen Vasektomie in Ländern mit enormer Bevölkerungsvermehrung zu verstehen ist, so daß bei späterem Kinderwunsch durch

Tabelle 1: Klinische Anwendung von Kryosperma zur heterologen Insemination.
 Nach Schill, W.-B.: Der Hautarzt 23, 525 - 530 (1972)

Autoren u. Jahr	Tiefgefrierverfahren	Gefrier- geschwin- digkeit	Lagerungs- temperatur °C	Zahl der Schwanger- Patienten schaften	Kon- zept.- rate %
Keettel et al. (1956)	10	schnell	-70	26	9 34,5
Behrman et al. (1966)	7,5 10 Eidotter	langsam	-196,5	28	12 42,9
Behrman et al. (1969)	7,5 10 Eidotter	langsam	-196,5	68	29 42,6
Matheson et al. (1969)	7,5 10 Eidotter	langsam	-196,5	7	3 42,8
Tyler (1971)	10	schnell	-198	122	86 70,4

die Spermakonservierung eine homologe Insemination möglich ist. Eugenische Gesichtspunkte können eine Rolle bei der Auswahl der in Frage kommenden Spermader spielen und schließlich könnten schwere Erbkrankheiten in der Linie des Mannes durch Donorinsemination umgangen werden (15,86).

3. Biochemie des Samens

3.1 Entwicklung und derzeitiger Stand der biochemischen Erforschung des Samens

Die routinemäßige Fertilitätsdiagnostik beruhte in der Vergangenheit fast ausschließlich auf klinischen Daten und der morphologischen Untersuchung des Ejakulats des Patienten. Allein die Tatsache, daß in vielen infertilen Ehen weder bei der Frau noch beim Manne ein Anhalt für eine Fertilitätsstörung zu finden ist, begründet die Forderung nach einer weitergehenden diagnostischen Abklärung. So widmete man in der Folgezeit viel Aufmerksamkeit auf die Biochemie des Samens, hierbei besonders auf die biochemische Untersuchung des Seminalplasmas. Es konnte bislang eine Vielzahl biochemisch aktiver Substanzen im Spermaliquor nachgewiesen werden, insbesondere Enzyme des Eiweiß- und Kohlenhydratstoffwechsels (64). In der Literatur wurden immer wieder Abhängigkeiten und Korrelationen dieser Stoffe zu klinischen und morphologischen Parametern des Ejakulats und zu männlichen Fertilitätsstörungen festgestellt (17, 32, 44, 48, 51, 52, 53, 54, 64, 79, 81, 83). Strenge Fertilitätsparameter im Sinne eines Diagnoseschlüssels existieren aber bislang leider nicht. Eine klinische Diagnosestellung kann aber nur aus der gemeinsamen Beurteilung morphologischer und biochemischer Befunde, der somatischen Untersuchung und einer erschöpfenden Anamnese gestellt werden (95).

Erste biochemische Untersuchungen des Spermas gehen auf Forscher wie IVANOV (1931) und HUGGINS et al. (1933) zurück (42, 45). IVANOV untersuchte 1931 mit der von Otto Warburg erfundenen Apparatur den Sauerstoffverbrauch der Spermatozoen (45). Entscheidende Impulse gingen ab 1939 von McLEOD und insbesondere von MANN in Cambridge aus. Der Anatom McLEOD arbeitete vornehmlich mit Humansperma,

während MANN tierisches Sperma untersuchte. Letzterer legte seine Ergebnisse in einer Monographie "The Biochemistry of Semen" 1954 und in einem Nachfolgewerk "The Biochemistry of Semen and of the Male Reproductive Tract" 1964 nieder (63,64). Die Zahl der Autoren, die zur Aufklärung der Biochemie des Samens beitrugen, ist groß. Einen kleinen Überblick gibt Tabelle 2.

Tabelle 2: Chronologisch geordnete Übersicht einiger im Spermaplasma aufgefundener Substanzen und Fermente (94).

Jahr	Autor	Substanz/Ferment
1677	Leeuwenhoek	Spermin
1927	Dudley, Rosenheim und Starling	Spermidin
1929	Schersten	Zitronensäure (Mensch)
1933	Huggins	Elektrolyte Na, K, Ca (Mensch)
1935	Kutscher und Wolbergs	Phosphatase (Mensch)
1942	Gray und Huggins	Elektrophorese (Mensch)
1945	Mann	Fruktose (Tier)
1950	McClean	Hyaluronidase (Mensch)
1951	Mann	Inosit (Eber)
1951	Mann und Leone	Ergothionein (Eber)
1956	Kimmig und Schirren	Inosit (Mensch)
1958	McLeod	Lactat-Dehydrogenase (Mensch)
1960	Flipse	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (Bulle)
1960	Povoa, Villela	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (Mensch)
1968	Stambaugh, Buckley	Akrosin (Kaninchen)

Die größte Rolle unter den im Seminalplasma biochemisch wirksamen Substanzen dürfte die Fruktose spielen. Zunächst als reduzierende Substanz, vornehmlich als Glukose, angesprochen, wurde sie erstmals durch MANN 1945 als Fruktoseosazon nachgewiesen (62). Mit seiner Entdeckung leitete er ein neues Kapitel in der Fertilitätsforschung und -diagnostik ein. Forschungen im Hinblick

auf die Frage nach Beziehungen zwischen Fruktosegehalt und endokrinologischen Parametern wurden durchgeführt. In der tierischen Spermaforschung wurde der sogenannte "Fruktose-Test" entwickelt (65). Auf die Verhältnisse beim Menschen übertragen, wurde festgestellt, daß Männer mit Androgenmangelerscheinungen stets auch einen herabgesetzten Fruktosespiegel im Seminalplasma zeigen (58). Die Spermaplasmafruktose korreliert allerdings nicht mit dem Gehalt an männlichen Hormonen (Alles-oder-Nichts-Gesetz). Daher gilt der Fruktosegehalt des Seminalplasmas heute als Parameter der sekretorischen Aktivität der Bläschendrüsen, während die Testosteronbestimmung im Harn oder im Serum ein zuverlässiger Indikator für die Androgenproduktion der Keimdrüsen ist (52). Eine direkte Beziehung zwischen dem Vorhandensein normalkonfigurierter Spermatozoen und der Spermatozoenmotilität ermöglicht die Bestimmung des Fruktoseabbaus in der Zeiteinheit (94). So ist die Fruktose- und Fruktolyseuntersuchung ein wichtiger biochemischer Parameter in der Fertilitätsdiagnostik. Der normale Fruktosegehalt des Seminalplasmas wird mit über 1200 μ /ml angegeben (95).

Eine weitere biochemische Substanz ist die 1929 von SCHERSTEN im Samen entdeckte Zitronensäure (94). Sie wird in der Prostata gebildet und steht ebenfalls im Zusammenhang mit der Testosteronproduktion des Mannes (95). Ähnlich wie für die Fruktose wurde ein Zitronensäuretest entwickelt, der bei der Beurteilung tierischer Fertilitätsstörungen gute Ergebnisse zeitigt, beim Mann jedoch nicht die Bedeutung der Fruktosebestimmung hat (94).

Die Hyaluronidase des Seminalplasmas, die durch Auflösung des Cumulus oophorus der weiblichen Keimzelle die Befruchtung ermöglicht, steht in enger Beziehung mit der Spermatozoenzahl (64). Weitere biochemische Untersuchungen galten der Aufklärung der Proteine des Seminal-

plasmas mittels Elektrophorese (31). Schließlich wurden Substanzen wie Inosit und Ergothionein entdeckt. Gehalt und Bedeutung der Elektrolyte im Samen wurden aufgeklärt (42,64,94).

Trotz der Vielzahl der im Spermaliquor biochemisch aktiven Substanzen hat sich bislang nur die Fruktose für die Praxis als wichtig erwiesen.

In den letzten Jahren erlangte die akrosomale Protease Akrosin Bedeutung für die biochemische Forschung. Sie stellt das Schlüsselenzym für die Penetration der Spermatozoen durch die Zona pellucida dar (87,88,89,92,93, 111,122). Sie konnte kürzlich im Einzelejakulat quantitativ bestimmt werden (27,96). Ihre Bedeutung für die Routinediagnostik bleibt allerdings vorläufig noch abzuwarten.

3.2 Untersuchte Enzyme

3.2.1 "Chymotrypsin-ähnliches Enzym" (CHY)

Im menschlichen Seminalplasma kommt eine Proteinase vor, die im alkalischen Bereich N^α-Acetyl-L-tyrosin-äthylester (ATEE) und Casein spaltet (61). Dieses sogenannte "Chymotrypsin-ähnliche Enzym", nach OETTLÉ (74) auch "Seminin" genannt, soll die Zervixmukus-Penetration der Spermatozoen unterstützen (70,123). Seine Beteiligung an der Spermaverflüssigung wird ebenfalls diskutiert (90,123).

In Split-Ejakulaten wird das Enzym hauptsächlich in der 1. Fraktion nachgewiesen. Dies läßt auf seine Prostataherkunft schließen (123). Möglicherweise wird es teilweise an die Spermatozooköpfe adsorbiert und kann so in den Zervixmukus mit eingeschleust werden (112, 119). Nach SUOMINEN kommen mehrere Formen dieses Enzyms im Seminalplasma vor (114,115).

Bereits KURZROCK und MILLER beschrieben eine Andau-

ung von Zervixmukus bei Zugabe von Seminalplasma (56). Eine Viskositätsänderung des Mukus wird bei Hinzutreten von Trypsin, Chymotrypsin oder Seminin beobachtet, die in vitro eine Beschleunigung der Spermatozoenwanderung bedingt und auch für die in vivo Zervix-Passage diskutiert wird (20,69,70).

Von keinem der bekannten Chymotrypsin-Inhibitoren des Seminalplasmas wird das Enzym gehemmt (26). Eine schwache und inkomplette Hemmung beschrieben SCHUMACHER und ZANEVELD durch Alpha_1x -Antichymotrypsin, einen ubiquitär im Genitaltrakt vertretenen Inhibitor, dessen Gehalt besonders im Mukus der Zervix, ähnlich dem des Akrosin-hemmers, kurz vor der Ovulation niedrig ist, während er in der infertilen Phase des weiblichen Zyklus ansteigt (97).

3.2.2 Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) (E.C. 2.6.1.1)

Die GOT ist ein in nahezu allen Körpergeweben und -flüssigkeiten vertretenes Enzym. Sie ist von großer Bedeutung in der Routinediagnostik vieler Krankheiten, wie Leberkrankheiten, periphere Myopathien und beim Herzinfarkt. Die GOT katalysiert den Aminogruppentransfer von der Asparaginsäure zur Glutaminsäure nach folgender Gleichung:

$$\text{Alpha-Ketoglutarat} + \text{Aspartat} \xrightleftharpoons{\text{GOT}} \text{Glutamat} + \text{Oxalacetat}$$

Ihr Nachweis wird im Blutserum erbracht (49).

Erstmals untersuchte FLIPSE 1960 gezielt das Seminalplasma von Bullen nach diesem Enzym (23). Er stellte fest, daß der Gehalt an GOT mit der Spermatozoenzahl korreliert. Im gleichen Jahr bestimmten POVOA und VILLELLA auch im Humansperma die GOT (78). Sie fanden ebenso wie 1961 GREGOIRE et al. (35) hohe GOT-Aktivitäten im Seminalplasma, die das 10- bis 20-fache der Werte im Blutserum betrugen (78). Außer den Spermatozoen, die dieses Enzym in den Mitochondrien des Mittelstücks enthalten, wird es in der Prostata gebildet (34,64,79).

Ab 1965 beschäftigten sich viele Forscher mit der Frage, in welchem Zusammenhang die GOT mit anderen Größen des Ejakulats, insbesondere bei Fertilitätsstörungen steht (17,44,48,53,79,81,82,83). So fanden ROUSSEL et al. (82) 1965 signifikante Korrelationen zur Dichte, zur Motilität und zu lebenden und abnormen Zellen des Bullen-ejakulats. JOEL et al. (48) stellten im gleichen Jahre fest, daß die GOT-Aktivität des Humanspermas von der Normozoospermie über Hypo-, Oligo- bis hin zur Azoo- und Aspermie abnahm. Diese Untersuchungen wurden sowohl im Gesamtejakulat, als auch in Prostata, in Bläschendrüssen, im Nebenhoden und Hoden durchgeführt.

PUMPINASKI et al. (79) beschrieben ebenfalls einen verminderten GOT-Gehalt bei Störungen der Spermiogenese. Sie untersuchten das Gesamtejakulat, den spermatozoen-freien Überstand und die Spermatozoen selbst.

DOHRMANN et al. (17) konnten die Ergebnisse von JOEL und PUMPINASKI nicht bestätigen. Sie bewiesen sogar ganz im Gegensatz zu den oben genannten Autoren, daß die in pathologischen Ejakulaten gefundenen Werte nur unwesentlich von den gefundenen Werten bei Normozoospermien abweichen. Eine differentialdiagnostische Abgrenzung pathologischen Spermas anhand der GOT-Aktivität halten sie nicht für möglich.

1969 untersuchte KIPPING 65 menschliche Ejakulate auf deren Transaminasegehalt. Hierbei stellte er für die GOT, deren Werte er auf den Eiweißgehalt des Spermas bezog, Beziehungen zur Samenmenge und zum Patientenalter auf. Die Zunahme an GOT mit steigendem Alter erklärte er mit der altersbedingten zunehmenden Porosität der die Samenflüssigkeit umgebenden Zellen der Samenwege und sekretbildenden Drüsen (53).

ISHIBE et al. untersuchten 1971 das Seminalplasma von Patienten mit Sex-Chromosomen-Abnormalitäten auf ver-

schiedene Enzyme. Korrelationen des Transaminasengehaltes zu anderen Spermakriterien ließen sich nicht aufstellen (44).

1972 unternahmen RUSKOVA et al. biochemische und morphologische Studien am Sperma von Patienten mit Erkrankungen des Genitalapparates. Sie fanden bei Oligoasthenozoospermien, besonders wenn gleichzeitig Entzündungszeichen am Genitaltrakt vorlagen, erhöhte Transaminaseaktivitäten. Sie bezogen diese höheren Werte auf eine veränderte Permeabilität der Spermatozoenmembranen im pathologischen Ejakulat (83).

Die Beziehung hoher Transaminasenwerte zu hoher Spermatozoendichte wird von der Mehrzahl der Autoren herausgestellt.

Einige Normalwerte der GOT aus der Literatur:

Dohrmann, R.E. et al. (17)	153 [±] 20 W.E. (Wroblewski-E.)
Ishibe, T. et al. (44)	391 Karmen-U/ml
Joel, C.A. et al. (48)	122 [±] 59 W.E.
Kipping, D. (53)	206 mU/g Eiweiß
Ruskova, S. et al. (83)	172 W.E.

3.2.3 Lactat-Dehydrogenase (LDH)

(E.C. 1.1.1.27)

Die LDH entstammt dem zytoplasmatischen Raum und kommt ubiquitär im Organismus vor. Ein Anstieg des LDH-Spiegels tritt bei Leberkrankheiten, Herzinfarkt, Myokarditis, Muskeldystrophie, hämolytischer und perniziöser Anämie, Karzinomen, Lungeninfarkt und Nierenkrankheiten auf. Ihr Nachweis wird im Blutserum geführt. Die LDH katalysiert die Reduktion von Pyruvat zu Lactat durch NADH_2 nach folgender Gleichung:



Erstmals wurde sie im Blutserum von WROBLEWSKI et al. dargestellt (121).

Da das Wachstum neoplastischer Zellen stets mit einem Anstieg der LDH-Aktivität verbunden ist und schnelles Wachstum ein Merkmal der menschlichen Spermatogenese ist, außerdem menschlicher Samen ebenso wie das LDH-Molekül große Mengen Zink enthält, vermuteten McLEOD et al. dieses Enzym auch im menschlichen Samen. Sie untersuchten normale Ejakulate und solche von infertilen und sterilen Männern. Im Vergleich zum Blutserum fanden sie bedeutend höhere Werte und stellten eine semiquantitative Beziehung der Enzymaktivität zur Spermatozoenzahl auf. Es wurde vermutet, daß ein großer Teil der Sperma-LDH aus der Prostata stammte (68).

Die LDH-Aktivität des Spermas kann in sechs Isoenzyme aufgetrennt werden. Mittels Agargel-Elektrophorese lassen sich die auch in anderen Körpergeweben nachweisbaren Isoenzyme $\text{LDH}_{\text{I-V}}$ sowie ein weiteres Isoenzym LDH_{X} , das zwischen LDH_{III} und LDH_{IV} erscheint, aufzeigen. Dieses LDH_{X} ist charakteristisch für den reifen Hoden und tritt im Seminalplasma nur zusammen mit Spermatozoen auf (9, 14, 19, 29, 120).

Eine Vielzahl von Autoren beschäftigte sich mit der Frage nach Zusammenhängen der LDH-Aktivität mit pathologischen Zuständen des männlichen Fertilitätsgeschehens (17, 32, 44, 83). Bis auf einige wenige, wie RUSKOVA et al. (83), die einen verminderten LDH-Gehalt in Beziehung zu funktionellen Störungen des Genitaltraktes setzten, oder ISHIBE et al. (44), die im Seminalplasma bei Azospermie eine Verminderung der Gesamt-LDH jedoch einen Anstieg des Isoenzyms LDH_{V} feststellten, erachten die meisten Autoren die LDH-Bestimmung als wenig aussagekräftig in Bezug auf die andrologische Diagnostik (17, 19, 32).

Einige Normalwerte der LDH aus der Literatur:

Eliasson, R. et al. (19)

1840 ± 88 mU/ml

Goldberg, E. (29)

Umsatz von $1,15$ Mol NADH_2 /
mg Protein

Ishibe, T. et al. (44)	3082 W.E.
McLeod, J. et al. (68)	5600 $\pm$ 470 spez. U/ml
Ruskova, S. et al. (83)	959 mU/ml

3.2.4 Alkalische und Saure Phosphatase (AP und SP) (E.C. 3.1.3.1 und E.C. 3.1.3.2)

Phosphatasen katalysieren die Hydrolyse von Phosphorsäureestern. Entsprechend den pH-Bereichen ihrer Wirkungsoptima werden alkalische und saure Phosphatasen unterschieden. Den Knochen und dem Lebergewebe entstammend kann die AP bei Erkrankungen dieser beiden Organsysteme ansteigen. Die SP ist erhöht bei Prostatakarzinom, bei Leberkrankheiten zusammen mit der AP, bei Morbus Paget und bei Leukämie.

Nachgewiesen werden die Phosphatasen im Blutserum (8).

KUTSCHER und WOLBERGS fanden 1935 heraus, daß männlicher Urin bedeutend reicher an Phosphatase ist als weiblicher. Bei ihren Untersuchungen ermittelten sie den Samen und das Prostatagewebe als die an saurer Phosphatase reichsten Quellen des menschlichen Körpers (57). Weitergehende Studien von SCOTT et al. (98) bewiesen, daß die SP des männlichen Urins hauptsächlich aus der Prostata stammt. Sie entnahmen den Urin direkt aus dem Nierenbecken und fanden darin nur geringe Enzymaktivität. Nach MANN enthalten auch die Spermatozoen SP (64).

Demgegenüber ist die Aktivität der AP, die aus Prostata und Bläschendrüse stammen soll, im menschlichen Seminalplasma nur gering. GUTMAN und GUTMAN fanden hohe SP-Werte, aber nur geringe AP-Aktivitäten (37). Über die Bedeutung dieses Enzyms für die Fertilität herrscht noch immer Unklarheit. Bislang konnten auch keine Beziehungen der AP für die andrologische Diagnostik aufgestellt werden (71).

Der Gehalt der Prostata an SP ist in der Kindheit gering und steigt mit Erreichen der Pubertät steil an (21,36).

Somit ist die SP einer der wichtigsten Indikatoren sekundärer Geschlechtsmerkmale (64). Zusammenhänge dieses Enzyms mit der Androgenaktivität werden diskutiert (21,38). Es läßt sich demonstrieren, daß nach Testosterongaben der Gehalt an SP ansteigt (51). Die Bestimmung der SP dient der Charakterisierung des Prostatasekrets. Beziehungen dieses Ferments zu anderen Fertilitäts-Parametern sind wenig aussagekräftig und auch kaum bewiesen (18,34,54,71,73,80,83).

AP- und SP-Werte bei Normozoospermie in der Literatur:

AP

Gutman, A.B. et al. (37)	0,1 - 1 mg Phenol/ml
Kipping, D. (54)	0,96 mME/g Protein
Moon, K.H. et al. (71)	4,9 Sigma U/ml
Nun, S. et al. (73)	6,4 Sigma U/ml
Ruskova, S. et al. (83)	4,6 BLU/ml (Bessy-Lowry Units)

SP

Eliasson, R. (18)	50000 IU/ml
Gutman, A.B. et al. (37)	700 - 3700 mg Phenol/ml
Kent, J.R. et al. (51)	4000 - 57000 Mol/ml
Kipping, D. (54)	1,28 mME/g Protein
Nun, S. et al. (73)	66,2 Sigma U/ml
Ruskova, S. et al. (83)	4585 BLU/ml

3.4 Biochemie des Kryospermas

Trotz der Anwendung schonender Einfriermethoden und der Verwendung von Kryoprotektiva ist die Lagerung von Sperma bei tiefen Temperaturen mit einer Qualitätsminderung verbunden. Insbesondere ist die qualitative und quantitative Motilität nach der Kryobehandlung vermindert (88). BEHRMAN und ACKERMAN berichteten, daß nach heterologer Insemination von Kryosperma in 43 % der Fälle eine Geburt erzielt

wurde gegenüber 68 % bei Verwendung von Nativsperma (5).

Schon 1947 beschrieb SWYER das Freiwerden von Hyaluronidase aus den Spermatozoen durch den Gefrierprozeß (116). Demgegenüber konnte ACKERMAN (2) keinen Austritt dieses Enzyms bei der Lagerung von Sperma in flüssigem Stickstoff feststellen. MANN (64), der die Spermatozoen als hochverwundbare, filiforme Strukturen bezeichnete, vermutete, daß jede mechanische Einwirkung auf diese Zellen, wie Zentrifugieren, Filtern und Waschen eine Verletzung verursacht, die mit dem Verlust chemischer Bestandteile in das umgebende Medium einhergeht. Er schrieb: "Die Möglichkeit kann nicht zurückgewiesen werden, daß ein Teil der Aktivität des Plasmas vom Verlust intrazellulärer Transaminasen während der Zentrifugation herrührt". Insbesondere hielt er den Tiefgefriervorgang verantwortlich für die Veränderung von Proteinen, Lipoproteinen, Dehydrogenasen und Oxydasen.

GRAHAM und PACE berichteten 1967 über einen Anstieg der Enzyme GOT und LDH, nachdem sie Bullensperma in flüssigen Stickstoff eingetaucht hatten (30). Die Analyse dieser beiden Enzyme erschien ihnen wichtig, um den Grad der Zellzerstörung nach dem Einfrieren zu bestimmen. Untersuchungen von BROWN et al. (11) führten zu den gleichen Ergebnissen. Sie untersuchten nach dem Tiefgefrieren Bullen-, Eber- und Truthahnsperma auf die Enzyme GOT, LDH, AP, SP und Cholinesterase. Von allen Fermenten erwies sich die GOT als bester Indikator einer Zellzerstörung.

Im Kälteschock auftretende, veränderte Stoffwechselbedingungen wurden von ACKERMAN beobachtet. Er beschrieb eine Zunahme der Milchsäure unter aeroben Bedingungen im Temperaturschock.(1). Wie bereits erwähnt, konnte er keine vermehrte Aktivität des Enzyms

Hyaluronidase nach dem Tiefgefriervorgang feststellen(2). Während er eine Beeinflussung des Zitronensäure-Stoffwechsels der Spermatozoen verneint, bemerkte er einige Veränderungen bei der Fruktolyse des Spermas unter der Kryobehandlung (3).

Eine Zu- oder Abnahme der Desoxyribonucleinsäure, des genetischen Materials menschlicher Spermatozoen und anderer Zellen, wurde während des Einfrierens und Auftauens nicht festgestellt (104). 1974 konnte SHERMAN (106) mit Hilfe der Fluoreszenz nachweisen, daß das Y-Chromosom des menschlichen Spermatozoons durch den Tiefgefriervorgang nicht geschädigt wird.

PEDERSEN und LEBECH beschrieben 1971 Veränderungen der akrosomalen Membran des Spermatozoons durch den Einfrierprozeß (75). Schädigungen der Plasmamembran und der äußeren akrosomalen Membran beobachteten auch SCHILL et al. (91,92,93). Lysosomale Enzyme können durch die geschädigte Akrosomenkappe austreten und somit die Befruchtungsfähigkeit des Spermas einschränken (72). Bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen an Kryosperma stellte SHERMAN (103,107) Veränderungen an der Struktur der Spermatozoen fest, insbesondere an den Mitochondrien und am endoplasmatischen Retikulum.

C. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

I. Material und Methoden

1. Untersuchungsmaterial

Zur Untersuchung gelangten 171 Ejakulate von Patienten der andrologischen Sprechstunde der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der Universität München. 81 der Proben wurden vor und nach dem Tiefgefrieren ohne Zusatz eines Kryoprotektivums auf die Enzyme "Chymotrypsin-ähnliches Enzym", Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, Lactat-Dehydrogenase, Alkalische und Saure Phosphatase untersucht und 90 Ejakulate vor und nach dem Tiefgefrieren unter Verwendung eines Kryoprotektivums auf ihren Gehalt an "Chymotrypsin-ähnlichem Enzym", Glutamat-Oxalacetat-Transaminase und Lactat-Dehydrogenase.

Die Ejakulate wurden mit 5 - 7-tägiger sexueller Karenz durch Masturbation in der Klinik gewonnen, nach morphologischen und klinischen Kriterien beurteilt (95) und in die folgenden Gruppen aufgeteilt: Normo-, Oligo-, Oligoastheno- und Asthenozoospermie (s. Tab. 3).

2. Vorbereitung der Proben zur biochemischen Untersuchung

Im Anschluß an die morphologische Beurteilung wurde jede Ejakulatprobe halbiert. Eine Hälfte des Ejakulats wurde zweimal zentrifugiert, zunächst mit 2000 U/min für 20 Minuten und dann mit 16000 U/min für 6 Minuten. Der so gewonnene, nahezu spermatozoenfreie Überstand wurde entsprechend den Erfordernissen der einzelnen Enzymbestimmungen mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Die zweite Hälfte der Ejakulatproben wurde für die Spermakonservierung verwendet.

3. Kryospermakonservierung

81 Ejakulate wurden ohne Kryoprotektivum und 90 Spermaproben mit 10 %igem Glycerinzusatz im Slow-freezing-Verfahren bei -196°C in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Tabelle 2: Gruppenaufteilung des Untersuchungsmaterials nach klinisch-andrologischen Gesichtspunkten.

Zeichenerklärung: N Anzahl der Proben; $\bar{x}$ Mittelwert; $s^{\pm}$ Standardabweichung;
 $s_{\bar{x}}$ mittlerer Fehler des Mittelwerts.

Gruppe	N	Alter Jahre	Karenz	Menge ml	Dichte Mill./ml	Beweglichkeit %	Fructose g
Gesamt	171	$\bar{x}$ 31,2 $s^{\pm}$ 6,2 $s_{\bar{x}}$ 0,4	5,8 2,3 0,1	3,9 1,6 0,1	50,3 49,5 3,7	57,5 16,8 1,2	2904,6 1365,7 104,4
Normo- zoospermie	63	$\bar{x}$ 32,6 $s^{\pm}$ 6,8 $s_{\bar{x}}$ 0,8	6,0 3,1 0,3	3,9 1,7 0,2	84,2 49,9 6,2	67,9 7,6 0,9	2803,3 1519,6 191,4
Oligo- zoospermie	47	$\bar{x}$ 30,4 $s^{\pm}$ 6,4 $s_{\bar{x}}$ 0,9	5,5 1,2 0,1	3,5 1,3 0,2	17,9 10,0 1,4	67,2 9,0 1,3	2861,7 1257,9 183,4
Oligo- astheno- zoospermie	40	$\bar{x}$ 30,7 $s^{\pm}$ 5,3 $s_{\bar{x}}$ 0,8	5,9 1,9 0,3	4,4 1,8 0,2	15,7 9,1 1,4	40,0 11,5 1,8	2951,1 1285,2 203,2
Asthenozoospermie	21	$\bar{x}$ 29,9 $s^{\pm}$ 5,2 $s_{\bar{x}}$ 1,1	5,6 2,2 0,4	4,1 1,2 0,2	87,2 52,9 11,5	38,0 14,3 3,1	3175,0 1309,0 285,6

Dazu wurde das Sperma in 1 ml-Tuberkulinspritzen aufgezogen, 15 Minuten bei $+4^{\circ}\text{C}$ im Kühlschrank equilibriert, anschließend 20 bis 30 Minuten in Stickstoffdampf mit einem Abstand von 6 cm vom Spiegel des flüssigen Stickstoffs eingebracht und dann in den flüssigen Stickstoff der Kryobehälter eingetaucht. Eine halbe Stunde später, wurden die auf -196°C tiefgekühlten Spermaproben entnommen, im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, die Motilität mikroskopisch bestimmt und in derselben Art und Weise aufbereitet wie das Nativsperma (s. Nr. 2).

Untersuchungen zum Verhalten der Enzyme gegenüber tiefen Temperaturen wurden mit Spermaliquor durchgeführt. Die Enzymaktivität frischen Seminalplasmas wurde mit der von Seminalplasma verglichen, das bei -196°C ohne und mit 10 %igem Glycerinzusatz eingefroren wurde. Es kam die gleiche Methodik zur Anwendung, die oben für das Vollsperma beschrieben wurde. Untersucht wurde im Seminalplasma die Aktivität des "Chymotrypsin-ähnlichen Enzyms" bei 8 Proben, bei jeweils 2 Proben die der übrigen Enzyme.

4. Photometrische Messungen

Sämtliche Enzymanalysen wurden mit dem Eppendorf-Photometer mit Küvettenwechselautomat und direkter Extinktions-schreibung vorgenommen. Hierzu wurden Einmal-Küvetten aus Plastik mit 1 cm Schichtdicke verwendet (Fa. SARSTEDT).

5. Biochemische Methodik

5.1 Analyse des "Chymotrypsin-ähnlichen Enzyms" (CHY)

Zur Bestimmung der Aktivitäten des CHY kam die von BERGMEYER und FRITZ et al. beschriebene Methode zur Anwendung (7,24,26).

Prinzip:

- 0,1 ml γ^3 -NAD (Fa. Boehringer Best.Nr. 15300)
2,35 ml Pyrophosphatpuffer pH 8,7 (15,2 g tetra-Natrium-
diphosphat-
10-hydrat
4,1 g Semicarbacid-
hydrochlorid
0,9 g Glycin
in 500 ml NaOH auf-
lösen)
0,5 ml N^α-Acetyl-L-tyrosin-äthylester (ATEE) -Lösung
(Fa. Merck Art. Nr. 83) (1,07 mg ATEE in 0,5 ml
Aqua dest. lösen)
0,02 ml Alkoholdehydrogenase (ADH)
(Fa. Boehringer Best. Nr. 15418)
----- 5 Minuten bei 25°C inkubieren -----
0,05 ml Seminalplasma (1:10 mit NaCl verdünnt)

Zu jeder Untersuchungsreihe wurde in gleicher Weise ein
Leerwert mit Aqua destillata angesetzt.

Bei 366 nm und 25°C wurde 10 Minuten lang die Extinktions-
zunahme einer jeden Probe gemessen. Die Berechnung der
Enzymaktivitäten geschah wie folgt: Eine Extinktions-
zunahme von 0,0011/min entsprach 1 mU/ml, wobei ΔE
(=Mittelwert der Extinktionen) des Leerwertes zuvor
von ΔE der Probe abgezogen wurde.

5.2 Analyse der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT)

Zur Untersuchung wurde der Merck-1-Test GOT - Optimierter
UV-Test (Art. Nr. 3351) verwendet. + Methode bei KARMEN (49).

Prinzip:

Die GOT-Aktivitäten wurden durch Einwirken des Seminal-
plasmas auf Alpha-Ketoglutarat und Aspartat bestimmt.
Dabei entstand Oxalacetat, das in Gegenwart von Malat-
dehydrogenase durch NADH₂ zu Malat umgewandelt wurde.
Die Geschwindigkeit des NADH₂-Verbrauchs war der GOT-
Aktivität direkt proportional (Extinktionsabnahme).

+) Für die freundliche Überlassung diverser Testsätze
zur Bestimmung der GOT, LDH und AP danken wir der
Fa. Merck, Darmstadt.

Konzentration im Test: 80 mM Phosphatpuffer pH 7,4
200 mM L-Aspartat, 12 mM Alpha-Ketoglutarat, 0,18 mM
NADH₂, 1,2 U/ml LDH, 0,6 U/ml MDH.

Ansatz:

2,0 ml Substrat-Puffer-Enzymgemisch, 25°C

0,5 ml Seminalplasma (1:10 mit physiol. NaCl verdünnt)

Die Extinktionsabnahme einer jeden Probe wurde 5 Minuten lang bei 366 nm und 25°C gemessen. Die Berechnung der Aktivität erfolgte durch Multiplikation von $\Delta E/\text{min}$ mit dem Faktor 1520 mU/ml.

5.3 Analyse der Lactat-Dehydrogenase (LDH)

Benutzt wurde der Merck-1-Test LDH - Optimierter UV-Test (Art. Nr. 3349). Methode bei WROBLEWSKI et al. (121).

Prinzip:

Die Geschwindigkeit der Reaktion von Seminalplasma mit Pyruvat und NADH₂ unter Entstehung von Lactat und NAD war der LDH-Aktivität direkt proportional.

Konzentration im Test: 0,6 mM Natriumpyruvat, 0,18 mM NADH₂, 50,0 mM Phosphatpuffer pH 7,5.

Ansatz:

3,0 ml Puffer-Substrat + NADH₂, 25°C

0,1 ml Seminalplasma (1:10 mit physiol. NaCl verdünnt)

Bei 366 nm und 25°C wurden die Proben 3 Minuten lang photometriert. Die Volumenaktivität in mU/ml entsprach dem Produkt aus $\Delta E/\text{min}$ und dem Faktor 9400.

5.4 Analyse der Alkalischen Phosphatase (AP)

Dieses Enzym wurde mit dem Merck-1-Test Alkalische Phosphatase - Optimierter kinetischer Test (Art. Nr. 3356) bestimmt. Methode bei BESSY et al. (8).

Konzentration im Test: 10,0 mM p-Nitrophenylphosphat, 0,5 mM MgCl₂, 1,0 M Diäthanolamin-HCl-Puffer pH 9,8.

Ansatz:

2,0 ml Substrat-Puffergemisch, 25°C

0,02 ml Seminalplasma (1:5 mit physiol. NaCl verdünnt)

Über 3 Minuten wurde die Extinktionszunahme bei 405 nm und 25°C gemessen. Zur Errechnung der Fermentaktivität in mU/ml wurde die $\Delta E/\text{min}$ mit dem Faktor 5460 multipliziert.

5.5 Analyse der Sauren Phosphatase (SP)

Zur Bestimmung der SP wurde die Bichemica-Test-Combination der Fa. Boehringer (Best. Nr. 15988) benutzt (8).

Prinzip:

Wiederum diente p-Nitrophenylphosphat als Substrat, das durch die Fermentwirkung in p-Nitrophenol und Phosphorsäure gespalten wurde. Durch Zugabe von Natronlauge wurde die Reaktion gestoppt und das p-Nitrophenol in das gelb gefärbte Anion überführt, das sich photometrisch bei 405 nm bestimmen ließ.

Konzentration im Test: 50,0 mM Citratpuffer pH 4,8,
5,5 mM p-Nitrophenylphosphat, 0,02 N Natronlauge.

Ansatz:

Probe Leerwert

1,0 ml 1,0 ml Puffer-Substratgemisch, 37°C Wasserbad

0,2 ml - Seminalplasma (1:10000 mit physiol. NaCl verdünnt)

----- 30 Minuten in ein Wasserbad von 37°C stellen -----

10,0 ml 10,0 ml 0,02 N Natronlauge

- 0,2 ml Seminalplasma (1:10000 mit physiol. NaCl verdünnt)

Die Extinktion der Probe wurde bei 405 nm gegen den Leerwert gemessen. Die Aktivität errechnete sich aus der Gleichung: Volumenaktivität in mU/ml = $E_{405} \times 101$.

6. Präzisionskontrollen

Zur Ermittlung der Fehlerbreite der einzelnen Untersuchungsmethoden wurde bei einer beliebigen Spermaprobe zehnmal die Enzymaktivität bestimmt. Dies wurde durch den Variations-Koeffizienten ausgedrückt, der sich nach der folgenden Formel errechnete:

$$\frac{\text{Standardabweichung der Enzymaktivitäten}}{\text{Mittelwert der Enzymaktivitäten}} \times 100 = x\%$$

Ein Variations-Koeffizient um 5 - 6 % wurde als ausreichend angenommen.

7. Statistische Auswertungen

Sämtliche Ergebnisse wurden mittels t-Test und gepaarten t-Test nach STUDENT auf ihre statistische Aussage geprüft (113).

II. Ergebnisse

In Vorversuchen wurden die optimalen Verdünnungsgrade des Seminalplasmas und die besten Verdünnungslösungen für die einzelnen Enzymbestimmungen ausgetestet. Es war wichtig, bei den kinetischen Tests eine gute Linearität zu gewährleisten, und insbesondere ΔE des Leerwertes bei der Aktivitätsmessung des CHY möglichst niedrig zu halten.

Für alle Verdünnungen wurde physiologische Kochsalzlösung benutzt. Zur CHY-, zur GOT- und zur LDH-Bestimmung wurde das Seminalplasma 1:10, zur AP- 1:5 und zur SP-Bestimmung 1:10000 verdünnt. Diese Verdünnungsgrade erwiesen sich als optimal.

Bei jeder Untersuchungsreihe erfolgte die Bestimmung der Sekundärmotilität, das heißt der Motilität nach dem Tiefgefrierprozeß. Es wurden Werte von durchschnittlich 13,3 % der Ausgangsmotilität bei Kältebehandlung ohne Kryoprotektivum gefunden. Beim Einfrieren unter Zusatz von 10 % Glycerin ergab sich eine Überlebensrate von 65 %.

Nahezu die Hälfte aller untersuchten Ejakulate wurden ohne Kryoprotektivum bei -196°C eingefroren. Es sollte versucht werden, durch eine eventuell deutlichere Zunahme an Enzym nicht nur eine Schädigung der Spermatozoen sondern auch die Herkunft der Enzyme - Spermatozoen oder Seminalplasma - aufzuzeigen.

1. Biochemische Spermauntersuchungen vor und nach Kältebehandlung

1.1 "Chymotrypsin-ähnliches Enzym" (CHY)

Bei 81 Ejakulaten wurde die Aktivität des CHY vor und nach Kryokonservierung ohne Kryoprotektivum bestimmt.

Die Gesamtheit der Proben ergab einen Mittelwert von 147,1 mU/ml bei Nativsperma und von 139,0 mU/ml beim Kryosperma. Diese Aktivitätsabnahme nach der Kältebehandlung war nicht signifikant ($p > 0,05$) (s. Tab. 4).

Tabelle 4: Bestimmung der CHY-Aktivität bei 81 Spermaproben vor und nach Kältebehandlung ohne Kryoprotektivum.

Enzymaktivität mU/ml		
	Nativsperma	nach Kälte- behandlung - 196° C
N	81	81
$\bar{x}$	147,1	139,0
$s \pm$	84,4	98,1
$s_{\bar{x}} \pm$	9,3	10,9
$p > 0,05$		

Bei 74 Proben, die mit 10 %igem Glycerinzusatz tiefgefroren wurden, ließ sich eine hoch signifikante Aktivitätsminderung ($p < 0,005$) nach dem Einfriervorgang feststellen (s. Tab. 5).

Tabelle 5: Bestimmung der CHY-Aktivität bei 74 Spermaproben vor und nach Kältebehandlung unter Zusatz von 10 % Glycerin als Kryoprotektivum.

Enzymaktivität mU/ml		
	Nativsperma	nach Kälte- behandlung - 196° C
N	74	74
$\bar{x}$	115,8	95,5
$s \pm$	141,8	130,6
$s_{\bar{x}} \pm$	16,4	15,1

An 8 Ejakulaten wurde das Verhalten des "Seminins" gegenüber tiefen Temperaturen geprüft. Zur Untersuchung gelangte das frische Seminalplasma und solches, das mit und ohne Kryoprotektivum bei -196°C tiefgefroren wurde. In keinem Falle konnten größere Zu- oder Abnahmen der Enzymaktivität nach der Kryobehandlung gemessen werden. Beim Vergleich des frischen Seminalplasmas mit dem, das bei -196°C ohne Kalteschutz eingefroren wurde, zeigte sich eine statistisch unauffällige ($p > 0,3$) Enzymabnahme (s. Tab. 5a).

Tabelle 5a: Bestimmung der CHY-Aktivität bei 8 Seminalplasma-proben vor und nach Kältebehandlung ohne und mit Zusatz von 10 % Glycerin als Kryoprotektivum.

Probe Nr.	Enzymaktivität mU/ml		
	Nativsperma	nach Kältebehandlung - 196°C ohne	mit 10 % Glycerin
301	147	138	144
302	131	127	125
303	91	109	100
304	140	140	159
305	245	231	256
306	104	95	113
307	136	154	160
308	139	121	113
N	8	8	8
$\bar{x}$	141,6	139,4	146,1
$s \pm$	46,1	41,4	49,6
$s_{\bar{x}} \pm$	16,3	14,6	17,5
$p > 0,3$			

In den Gruppen Normo- und Oligozoospermie ergaben sich bei Zusatz eines Kryoprotektivums hoch signifikante Enzymabnahmen, während sie ohne Zusatz nur signifikant

Tabelle 6: Bestimmung der CHY-Aktivität bei 27 Spermaproben mit Normozoospermie vor und nach Kältebehandlung ohne Kryoprotektivum.

Probe Nr.	Enzymaktivität mU/ml	
	Nativsperma	nach Kälte- behandlung - 196° C
102	436	327
104	200	200
105	327	327
106	308	308
107	127	109
113	146	164
114	91	73
117	18	0
118	91	91
120	127	164
121	145	182
146	182	171
147	182	164
148	191	182
149	164	146
150	177	164
151	181	172
153	164	156
154	174	162
155	172	158
158	182	172
159	164	146
161	164	146
162	191	182
163	182	146
164	191	164
170	0	0
N	27	27
$\bar{x}$	173,2	162,1
s $\pm$	84,7	75,4
s $\pm$ $\bar{x}$	16,3	14,5
p < 0,025		

Tabelle 7: Bestimmung der CHY-Aktivität bei 27 Spermaproben mit Normozoospermie vor und nach Kältebehandlung unter Zusatz von 10 % Glycerin als Kryoprotektivum.

Probe		Enzymaktivität mU/ml
Nr.	Nativsperma	nach Kältebehandlung - 196° C
209	73	20
210	0	0
212	109	0
216	200	0
217	255	20
236	127	60
240	491	420
241	455	440
245	146	140
248	218	180
249	146	120
259	109	80
262	36	20
265	146	120
266	91	80
267	91	80
269	18	20
272	0	0
274	290	200
275	400	320
277	54	40
278	149	120
280	127	100
281	18	60
282	9	10
289	91	50
290	54	40
N		27
$\bar{x}$		144,5
$s \pm$		133,2
$s_{\bar{x}} \pm$		25,6
		23,0
$p < 0,0005$		

Tabelle 8: Bestimmung der CHY-Aktivität bei 20 Spermaproben mit Oligozoospermie vor und nach Kältebehandlung ohne Kryoprotektivum.

Probe Nr.	Enzymaktivität mU/ml	
	Nativsperma	nach Kälte- behandlung - 196° C
108	146	146
109	164	191
115	164	55
116	237	91
124	109	55
129	183	109
137	127	127
141	109	36
152	128	91
156	148	102
167	164	146
168	36	36
169	564	582
171	74	109
172	109	0
176	109	73
177	109	73
178	109	109
180	164	255
181	218	164
N	20	20
$\bar{x}$	159,5	127,5
s $\pm$	106,0	121,9
s $\pm$ $\bar{x}$	23,7	27,2
$p < 0,0125$		

Tabelle 9: Bestimmung der CHY-Aktivität bei 19 Spermaproben mit Oligozoospermie vor und nach Kältebehandlung unter Zusatz von 10 % Glycerin als Kryoprotektivum.

Probe Nr.	Enzymaktivität mU/ml	
	Nativsperma	nach Kälte- behandlung - 196° C
204	273	220
208	0	0
214	0	0
215	36	20
225	55	20
232	55	40
238	36	20
261	965	860
263	91	40
270	36	20
271	73	60
276	109	60
279	109	100
282	54	0
284	82	70
285	54	30
286	191	160
287	154	50
288	54	40
N	19	19
$\bar{x}$	127,7	95,2
$s^{\pm}$	213,2	193,37
$s_{\bar{x}}^{\pm}$	48,9	44,3
$p < 0,0005$		

Tabelle 10: Bestimmung der CHY-Aktivität bei 20 Spermaproben mit Oligoasthenozoospermie vor und nach Kältebehandlung ohne Kryoprotektivum.

Probe		Enzymaktivität mU/ml
Nr.	Nativsperma	nach Kältebehandlung - 196° C
103	182	164
110	55	55
111	91	109
112	55	0
125	91	36
127	200	200
128	73	145
130	145	109
131	91	55
132	73	109
133	18	55
134	218	36
135	73	127
136	55	0
138	164	182
139	146	0
140	164	55
142	146	55
143	55	127
144	146	127
N	20	20
$\bar{x}$	112,1	87,2
s $\pm$	56,9	60,8
s $\pm$ $\frac{\pm}{\bar{x}}$	12,7	13,6
p > 0,05		

Tabelle 11: Bestimmung der CHY-Aktivität bei 21 Spermaproben mit Oligoasthenozoospermie vor und nach Kältebehandlung unter Zusatz von 10 % Glycerin als Kryoprotektivum.

Probe Nr.	Enzymaktivität mU/ml	
	Nativsperma	nach Kälte- behandlung - 196° C
201	200	255
202	220	182
203	260	218
205	163	0
207	73	0
213	100	36
219	20	0
222	200	127
224	80	18
226	40	55
227	80	127
228	40	36
229	60	18
230	40	18
231	60	36
233	0	0
239	20	18
242	40	164
243	120	91
252	200	36
256	240	101
N	21	21
$\bar{x}$	96,1	84,3
s^2	86,8	75,8
$s^2_{\bar{x}}$	18,9	16,5
$p > 0,2$		

Tabelle 12: Bestimmung der CHY-Aktivität bei 14 Spermaproben mit Asthenozoospermie vor und nach Kältebehandlung ohne Kryoprotektivum.

Probe Nr.	Enzymaktivität mU/ml	
	Nativsperma	nach Kälte- behandlung - 196° C
101	418	400
119	55	73
122	255	164
123	73	182
126	164	182
145	182	91
157	190	182
160	191	182
165	200	182
166	182	164
173	0	55
174	91	91
175	200	182
179	91	0
N	14	14
$\bar{x}$	163,7	152,1
$s_{\bar{x}}^{+}$	101,9	93,3
$s_{\bar{x}}^{-+}$	27,2	24,9
$p > 0,35$		

Tabelle 13: Bestimmung der CHY-Aktivität bei 7 Spermaproben mit Asthenozoospermie vor und nach Kältebehandlung unter Zusatz von 10 % Glycerin als Kryoprotektivum.

Probe Nr.	Enzymaktivität mU/ml	
	Nativsperma	nach Kälte- behandlung - 196° C
206	73	20
211	18	0
221	73	120
237	55	20
260	164	220
268	36	20
273	55	40
N	7	7
$\bar{x}$	67,7	62,8
$s \pm$	46,7	79,5
$s_{\bar{x}} \pm$	17,6	30,0
$p > 0,35$		

Abb. 1: Schematische Darstellung der Aktivität des CHY in allen Gruppen (V = vor, N = nach Kältebehandlung ohne Kryoprotektivum)

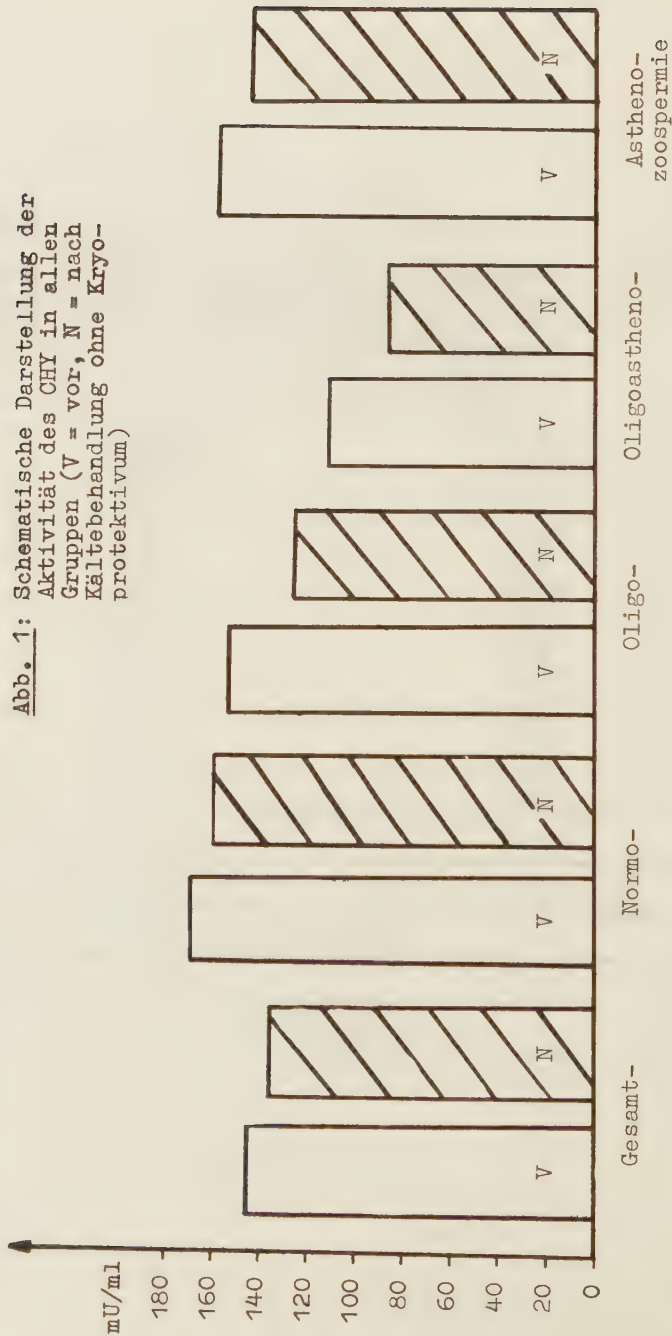
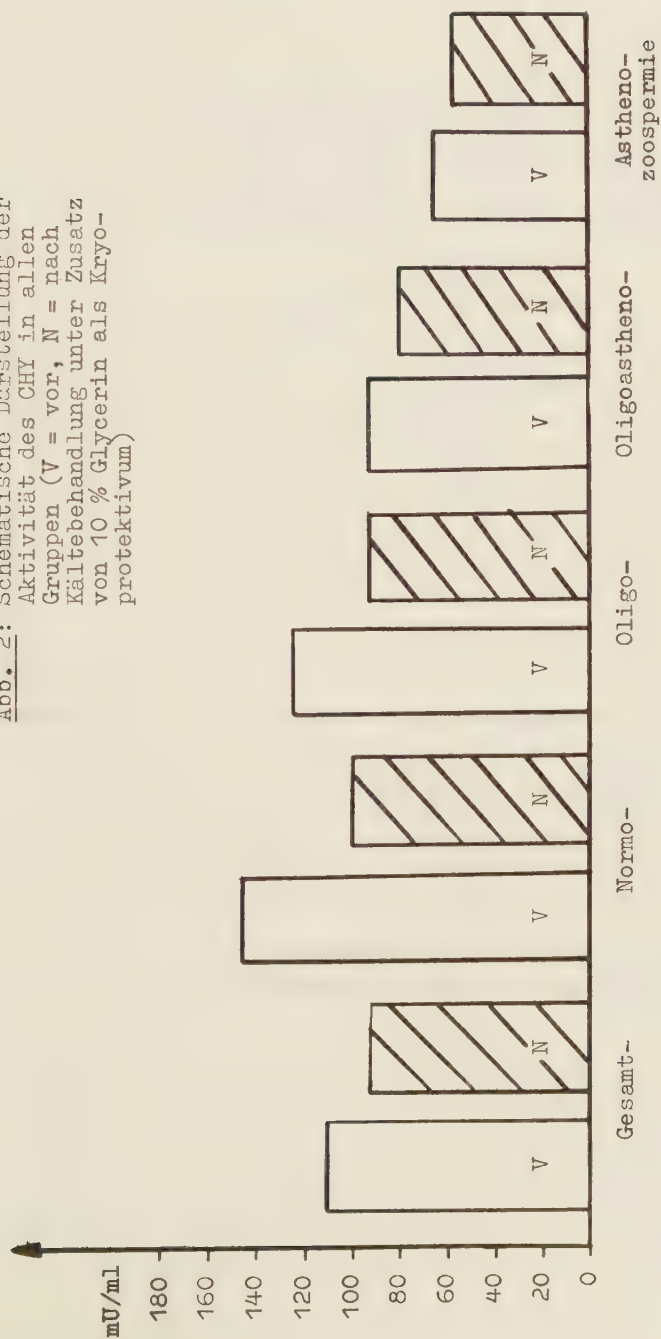


Abb. 2: Schematische Darstellung der Aktivität des CHY in allen Gruppen (V = vor, N = nach Kältebehandlung unter Zusatz von 10 % Glycerin als Kryoprotektivum)



waren. Bei den Gruppen mit Oligoastheno- und Asthenozoospermie ohne und mit Glycerin (oG und mG) wurden keine signifikanten Abnahmen verzeichnet. Einen Überblick über diese Gruppen geben die Tabellen 6 - 13 und die Abbildungen 1 und 2.

Der Variations-Koeffizient der Untersuchungsmethode lag bei 14,3 %.

1.2 Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT)

Die Bestimmungen der GOT vor und nach Kältebehandlung ohne Kryoprotektivum wurden an 81 Spermaproben vorgenommen. Es fanden sich Durchschnittswerte von 137,1 mU/ml vor und 233,4 mU/ml nach der Kryokonservierung. Eine geringere Zunahme ergab sich bei Zusatz von Glycerin. Bei 73 Proben stieg der Mittelwert von 122,6 mU/ml auf 169,6 mU/ml. Die Zunahme in beiden Vergleichsgruppen war hoch signifikant ($p < 0,0005$) (s. Tab. 14 und 15).

Während in allen übrigen Gruppen hoch signifikante Enzymzunahmen zu verzeichnen waren, ergab sich in der Gruppe Asthenozoospermie, die mit Glycerin kryokonserviert wurde, eine statistisch nur auffällige Veränderung (s. Tab. 16 - 23 und Abb. 3 und 4).

Bei der Untersuchung von 2 Seminalplasma-proben auf ihren GOT-Gehalt ergaben sich vor und nach der Kältebehandlung mit und ohne Glycerin nahezu gleiche Aktivitäten.

Für die Methodik der GOT-Bestimmung wurde ein Variations-Koeffizient von 4,1 % errechnet.

Tabelle 14: Bestimmung der GOT-Aktivität bei 81 Spermaproben vor und nach Kältebehandlung ohne Kryoprotektivum.

Enzymaktivität mU/ml		
	Nativsperma	nach Kälte- behandlung - 196° C
N	81	81
$\bar{x}$	137,1	233,4
s $\pm$	60,5	142,6
s $\bar{x}$ $\pm$	6,6	15,7
p= 0,0005		

Tabelle 15: Bestimmung der GOT-Aktivität bei 73 Spermaproben vor und nach Kältebehandlung unter Zusatz von 10 % Glycerin als Kryoprotektivum.

Enzymaktivität mU/ml		
	Nativsperma	nach Kälte- behandlung - 196° C
N	73	73
$\bar{x}$	122,6	169,6
s $\pm$	52,0	87,6
s $\bar{x}$ $\pm$	6,0	10,2
p= 0,0005		

Tabelle 16: Bestimmung der GOT-Aktivität bei 27 Spermaproben mit Normozoospermie vor und nach Kältebehandlung ohne Kryoprotektivum.

Probe		Enzymaktivität mU/ml
Nr.	Nativsperma	nach Kältebehandlung - 196° C
102	131	257
104	141	255
105	150	207
106	237	511
107	106	179
113	97	124
114	188	112
117	222	444
118	82	152
120	161	316
121	155	307
146	137	211
147	145	198
148	160	195
149	152	240
150	148	255
151	148	238
153	156	264
154	148	273
155	154	228
158	158	282
159	162	270
161	158	234
162	204	296
163	156	244
164	174	266
170	100	204
N	27	27
$\bar{x}$	152,9	250,4
s ±	34,2	83,7
$s_{\bar{x}} \pm$	6,6	16,0
$p < 0,0005$		

Tabelle 17: Bestimmung der GOT-Aktivität bei 27 Spermaproben mit Normozoospermie vor und nach Kältebehandlung unter Zusatz von 10 % Glycerin als Kryoprotektivum.

Probe Nr.	Enzymaktivität mU/ml	
	Nativsperma	nach Kälte- behandlung - 196° C
209	132	229
210	147	217
212	177	268
216	127	201
217	106	162
234	86	151
236	91	111
240	228	351
241	111	128
244	111	139
245	172	279
246	127	139
248	86	111
249	147	212
251	81	172
253	106	165
254	126	206
257	150	187
258	101	132
259	218	396
262	91	111
264	117	128
265	127	128
266	182	217
267	147	223
269	81	150
272	142	195
N	27	27
$\bar{x}$	130,2	189,1
$s \pm$	39,2	70,9
$s_{\bar{x}} \pm$	7,5	13,6
$p < 0,0005$		

Tabelle 18: Bestimmung der GOT-Aktivität bei 20 Sperma-
proben mit Oligozoospermie vor und nach
Kältebehandlung ohne Kryoprotektivum.

Probe Nr.	Enzymaktivität mU/ml	
	Nativsperma	nach Kälte- behandlung - 196° C
102	143	231
109	122	225
115	73	435
116	70	100
124	70	100
129	109	146
137	75	225
141	61	106
152	88	182
156	94	188
167	94	112
168	137	274
169	94	125
171	122	179
172	131	338
176	109	155
177	164	292
178	116	143
180	76	295
181	151	182
N	20	20
$\bar{x}$	104,0	201,6
$s \pm$	28,7	89,1
$s_{\bar{x}} \pm$	6,4	19,9
$p < 0,0005$		

Tabelle 19: Bestimmung der GOT-Aktivität bei 18 Spermaproben mit Oligozoospermie vor und nach Kältebehandlung unter Zusatz von 10 % Glycerin als Kryoprotektivum.

Probe		Enzymaktivität mU/ml
Nr.	Nativsperma	nach Kältebehandlung - 196° C
204	132	139
208	41	111
214	46	84
215	106	167
218	117	89
219	56	78
223	106	89
225	101	145
232	122	139
235	46	73
238	71	73
247	86	89
250	76	84
255	66	95
261	238	323
263	91	111
270	86	123
271	86	123
N		18
$\bar{x}$		92,9
$s_{\pm}$		45,0
$s_{\pm}$ $\bar{x}$		10,6
		13,6
$p < 0,0025$		

Tabelle 20: Bestimmung der GOT-Aktivität bei 20 Spermaproben mit Oligoasthenozoospermie vor und nach Kältebehandlung ohne Kryoprotektivum.

Probe Nr.	Enzymaktivität mU/ml	
	Nativsperma	nach Kälte- behandlung - 196° C
103	170	254
110	131	143
111	97	103
112	82	119
125	106	119
127	204	459
128	76	109
130	82	94
131	100	155
132	76	116
133	67	76
134	198	289
135	119	146
136	88	122
138	164	222
139	164	112
140	116	73
142	76	91
143	73	103
144	88	122
N	20	20
$\bar{x}$	113,8	151,3
s $\pm$	43,3	92,0
s $\pm$ $\bar{x}$	9,7	20,5
p < 0,01		

Tabelle 21: Bestimmung der GOT-Aktivität bei 21 Spermaproben mit Cligoasthenozoospermie vor und nach Kältebehandlung unter Zusatz von 10 % Glycerin.

Probe Nr.	Enzymaktivität mU/ml	
	Nativsperma	nach Kälte- behandlung - 196° C
201	147	212
202	106	151
203	137	151
205	91	84
207	96	111
213	101	201
219	147	273
222	132	173
224	51	72
226	106	157
227	177	234
228	66	84
229	157	201
230	106	139
231	86	95
233	122	251
239	81	95
242	86	100
243	117	123
252	126	156
256	150	165
N	21	21
$\bar{x}$	113,7	153,7
$s^{\pm}$	32,0	58,1
$s_{\bar{x}}^{\pm}$	6,8	12,6
$p < 0,0005$		

Tabelle 22: Bestimmung der GOT-Aktivität bei 14 Spermaproben mit Asthenozoospermie vor und nach Kältebehandlung ohne Kryoprotektivum.

Probe Nr.	Enzymaktivität mU/ml	
	Nativsperma	nach Kälte- behandlung - 196° C
101	120	193
119	109	179
122	91	122
123	149	359
126	447	973
145	140	301
157	178	366
160	188	348
165	172	344
166	166	356
173	374	699
174	210	556
175	195	274
179	67	73
N	14	14
$\bar{x}$	186,1	367,3
$s^{\pm}$	104,4	238,4
$s_{\bar{x}}^{\pm}$	27,9	63,7
$p < 0,0005$		

Tabelle 23: Bestimmung der GOT-Aktivität bei 7 Spermaproben mit Asthenozoospermie vor und nach Kältebehandlung unter Zusatz von 10 % Glycerin als Kryoprotektivum.

Probe Nr.	Enzymaktivität mU/ml	
	Nativsperma	nach Kälte- behandlung -196° C
206	233	301
211	127	167
221	177	251
237	101	139
260	339	612
268	137	145
273	258	290
N	7	7
$\bar{x}$	196,0	272,1
$s \pm$	84,9	164,3
$s_{\bar{x}} \pm$	32,1	62,1
$p < 0,05$		

Abb. 3: Schematische Darstellung der Aktivität der GOT in allen Gruppen (V = vor, N = nach Kältebehandlung ohne Kryoprotektivum)

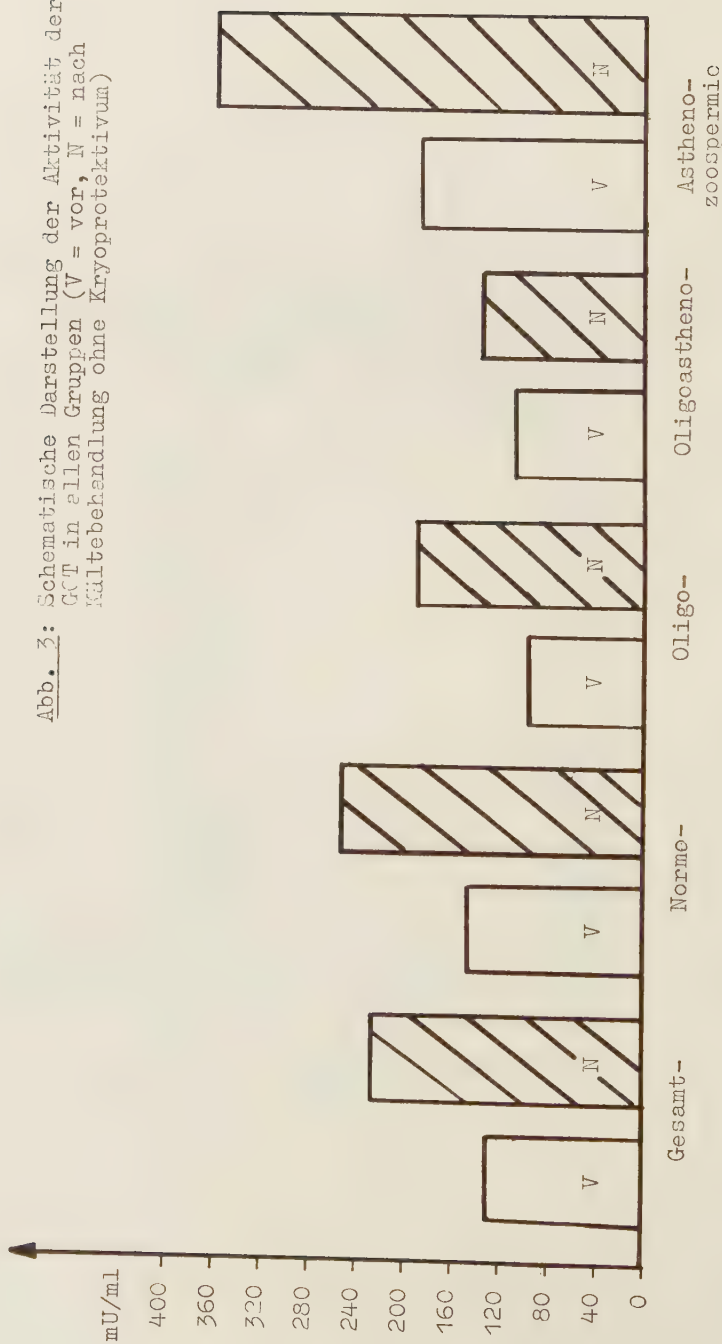
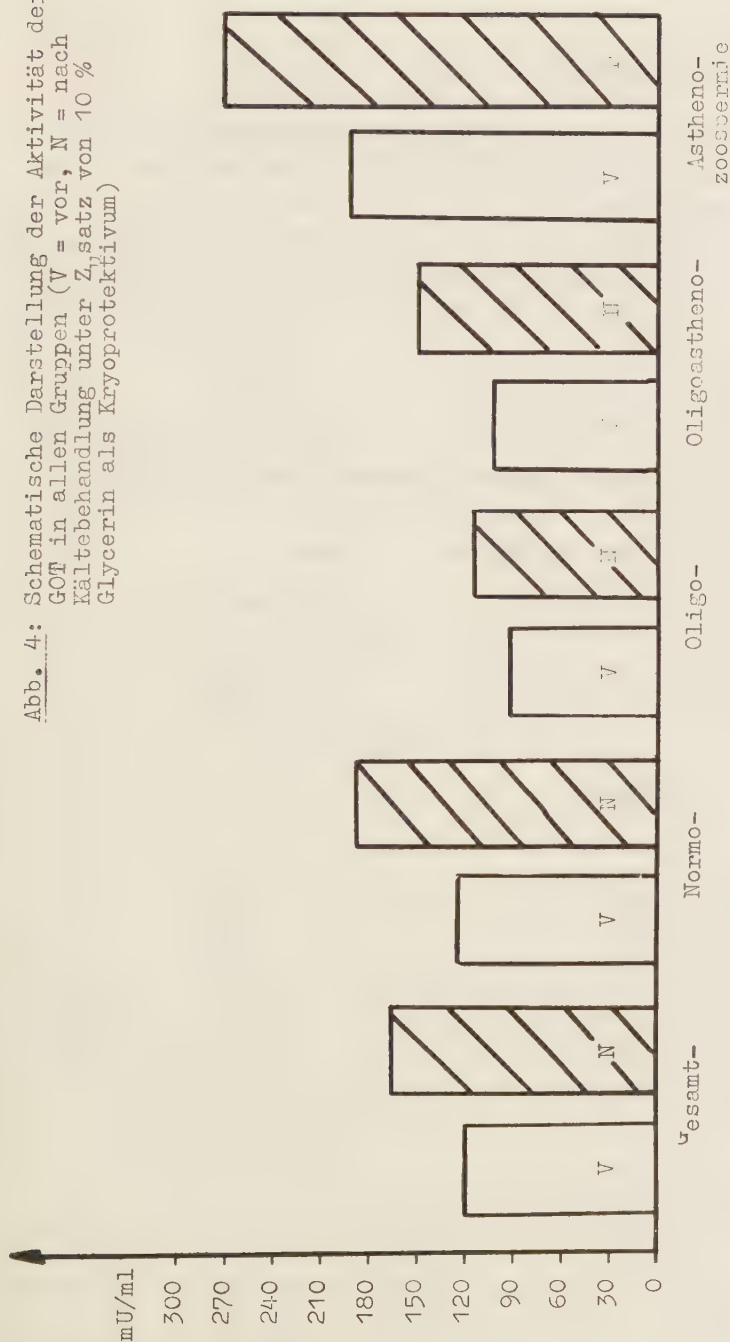


Abb. 4: Schematische Darstellung der Aktivität der GOT in allen Gruppen (V = vor, N = nach Kältebehandlung unter Zusatz von 10 % Glycerin als Kryoprotektivum)



1.3 Lactat-Dehydrogenase (LDH)

Bei 81 Ejakulaten ohne und 73 mit Kryoprotektivum wurde die LDH-Aktivität bestimmt. Wie schon bei der Bestimmung der GOT fanden sich auch hier bei allen Gruppen hoch signifikante Aktivitätszunahmen nach der Kältebehandlung, während bei der Gruppe Asthenozoospermie mG die Zunahme nur statistisch auffällig war.

Einen Überblick vermitteln die Tabellen 24 - 33 und die Abbildungen 5 und 6.

Die Aktivitätsbestimmungen, die am Seminalplasma von 2 Proben vorgenommen wurden, ergaben nach dem Tiefgefriervorgang nur unwesentlich veränderte Werte gegenüber denen beim frischen Seminalplasma.

Der Variations-Koeffizient lag im Falle der LDH bei 5,2 %.

Tabelle 24: Bestimmung der LDH-Aktivität bei 81 Spermaproben vor und nach Kältebehandlung ohne Kryoprotektivum.

	Enzymaktivität mU/ml	
	Nativsperma	nach Kältebehandlung - 196° C
N	81	81
$\bar{x}$	2008,8	2977,2
$s \pm$	1134,6	1556,4
$s_{\bar{x}} \pm$	126,0	172,9
$p < 0,0005$		

Tabelle 25: Bestimmung der LDH-Aktivität bei 73 Spermaproben vor und nach Kältebehandlung unter Zusatz von 10 % Glycerin als Kryoprotektivum.

	Enzymaktivität mU/ml	
	Nativsperma	nach Kältebehandlung - 196° C
N	73	73
$\bar{x}$	1677,5	2151,8
$s \pm$	772,0	943,5
$s_{\bar{x}} \pm$	90,3	110,4
$p < 0,0005$		

Tabelle 26: Bestimmung der LDH-Aktivität bei 27 Spermaproben mit Normozoospermie vor und nach Kältebehandlung ohne Kryoprotektivum.

Probe Nr.	Enzymaktivität mU/ml	
	Nativsperma	nach Kälte- behandlung - 196° C
102	1457	2613
104	1706	3210
105	3227	3854
106	3130	6260
107	2193	2415
113	971	1128
114	2600	1379
117	3133	6298
118	1692	2413
120	2381	3415
121	2318	3948
146	2115	3120
147	1798	3560
148	1898	4017
149	1918	3230
150	2235	3970
151	2018	4112
153	1740	2988
154	2116	3448
155	1962	3070
158	2060	3368
159	2016	4110
161	1904	3860
162	1848	3890
163	1640	3620
164	1998	4006
170	1692	2099
N	27	27
$\bar{x}$	2069,9	3561,7
$s \pm$	494,9	1239,3
$s_{\bar{x}} \pm$	93,5	234,2
$p < 0,0005$		

Tabelle 27: Bestimmung der LDH-Aktivität bei 27 Spermaproben mit Normozoospermie vor und nach Kältebehandlung unter Zusatz von 10 % Glycerin als Kryoprotektivum.

Probe Nr.	Enzymaktivität mU/ml	
	Nativsperma	nach Kälte- behandlung - 196° C
209	2068	2688
210	1517	1965
212	2256	3000
216	1849	2068
217	1880	2068
234	1092	2344
236	595	1482
240	2757	3653
241	1379	1551
244	1535	1758
245	2977	4033
246	2654	2757
248	1191	1379
249	2131	2792
251	1119	2206
253	2320	2792
254	1410	1792
257	2914	1969
258	1062	1482
259	3540	4198
262	658	1034
264	1316	1689
265	1222	1620
266	2475	2826
267	1755	2240
269	971	1413
272	1598	2519
N	27	27
$\bar{x}$	1786,7	2274,0
s $\pm$	755,3	808,5
s $_{\bar{x}}$ $\pm$	145,3	155,6
$p < 0,0005$		

Tabelle 28: Bestimmung der LDH-Aktivität bei 20 Spermaproben mit Oligozoospermie vor und nach Kältebehandlung ohne Kryoprotektivum.

Probe Nr.	Enzymaktivität mU/ml	
	Nativsperma	nach Kälte- behandlung - 196° C
108	2099	2663
109	1692	2820
115	783	5201
116	1222	1692
124	1034	1473
129	1911	1410
137	1034	1347
141	501	564
152	1346	2096
156	1288	2098
167	1379	1535
168	1880	3541
169	1128	1441
171	1410	2005
172	2350	4543
176	1598	2131
177	2444	2883
178	1222	1473
180	940	1159
181	2413	3823
N	20	20
$\bar{x}$	1483,7	2294,9
$s \pm$	552,7	1199,1
$s_{\bar{x}} \pm$	123,5	268,1
$p < 0,01$		

Tabelle 29: Bestimmung der LDH-Aktivität bei 18 Spermaproben mit Oligozoospermie vor und nach Kältebehandlung unter Zusatz von 10 % Glycerin als Kryoprotektivum.

Enzymaktivität mU/ml		
Probe		nach Kälte-
Nr.	Nativsperma	behandlung
		- 196° C
204	1222	1517
208	1965	2275
214	1347	1241
215	2162	2378
218	971	793
220	1096	1758
223	439	758
225	1504	1999
232	3227	3240
235	846	1000
238	595	689
247	752	896
250	1063	1231
255	660	1133
261	3666	4010
263	1159	1275
270	1379	2068
271	846	1275
N	18	18
$\bar{x}$	1383,2	1640,8
$s \pm$	874,9	897,0
$s_{\bar{x}} \pm$	206,2	211,4
$p < 0,0005$		

Tabelle 30: Bestimmung der LDH-Aktivität bei 20 Spermaproben mit Oligoasthenozoospermie vor und nach Kältebehandlung ohne Kryoprotektivum.

Probe Nr.	Enzymaktivität mU/ml	
	Nativsperma	nach Kälte- behandlung - 196° C
103	1706	3694
110	1720	2005
111	1097	1128
112	1379	1974
125	1410	1535
127	4543	8021
129	1410	1723
130	1379	1222
131	1692	2538
132	1629	2162
133	1191	1128
134	2726	3290
135	2663	2851
136	1097	1410
138	2507	3635
139	2005	2350
140	1598	2068
142	971	1379
143	1222	1316
144	815	1222
N	20	20
$\bar{x}$	1738,0	2332,5
$s^{\pm}$	849,0	1566,7
$s_{\bar{x}}^{\pm}$	189,8	350,3
$p < 0,0025$		

Tabelle 31: Bestimmung der LDH-Aktivität bei 21 Spermaproben mit Oligoasthenozoospermie vor und nach Kältebehandlung unter Zusatz von 10 % Glycerin als Kryoprotektivum.

Probe Nr.	Enzymaktivität mU/ml	
	Nativsperma	nach Kälte- behandlung - 196° C
201	627	4136
202	1567	2171
203	2663	3068
205	1535	1620
207	1241	1896
213	2319	3068
219	971	2654
222	1473	2645
224	783	1448
226	1598	2275
227	2757	3688
228	909	1092
229	1629	1758
230	1943	2413
231	1410	1551
233	2131	2999
239	1379	1535
242	1535	1551
243	1585	1598
252	1560	1726
256	1441	1895
N	21	21
$\bar{x}$	1574,0	2159,4
s^+	553,4	827,6
$s_{\bar{x}}^+$	120,7	180,6
$p < 0,0025$		

Tabelle 32: Bestimmung der LDH-Aktivität bei 14 Spermaproben mit Asthenozoospermie vor und nach Kältebehandlung ohne Kryoprotektivum.

Probe Nr.	Enzymaktivität mU/ml	
	Nativsperma	nach Kälte- behandlung - 196° C
101	1753	2538
119	2318	2695
122	1473	1880
123	2413	4637
126	7081	8585
145	2225	3635
157	2900	4356
160	2948	4258
165	2940	4088
166	2860	4150
173	8147	6393
174	2945	4112
175	1974	2037
179	1159	1347
N	14	14
$\bar{x}$	3081,1	3943,6
s $\pm$	2015,9	1948,3
s $\pm$ $\bar{x}$	538,7	520,7
$p < 0,0005$		

Tabelle 33: Bestimmung der LDH-Aktivität bei 7 Spermaproben mit Asthenozoospermie vor und nach Kältebehandlung unter Zusatz von 10 % Glycerin als Kryoprotektivum.

Probe Nr.	Enzymaktivität mU/ml	
	Nativsperma	nach Kälte- behandlung - 196° C
206	1896	2964
211	2275	2309
221	1535	2619
237	1567	1758
260	3666	5687
268	2162	2275
273	3165	3171
N	7	7
$\bar{x}$	2323,7	2969,0
$s_{\bar{x}}^{+}$	807,8	1286,7
$s_{\bar{x}}^{-}$	305,3	486,3
$p < 0,05$		

Abb. 5: Schematische Darstellung der Aktivität der LDH in alle: Gruppen (V = vor, N = nach Kältebehandlung ohne Kryoprotektivum)

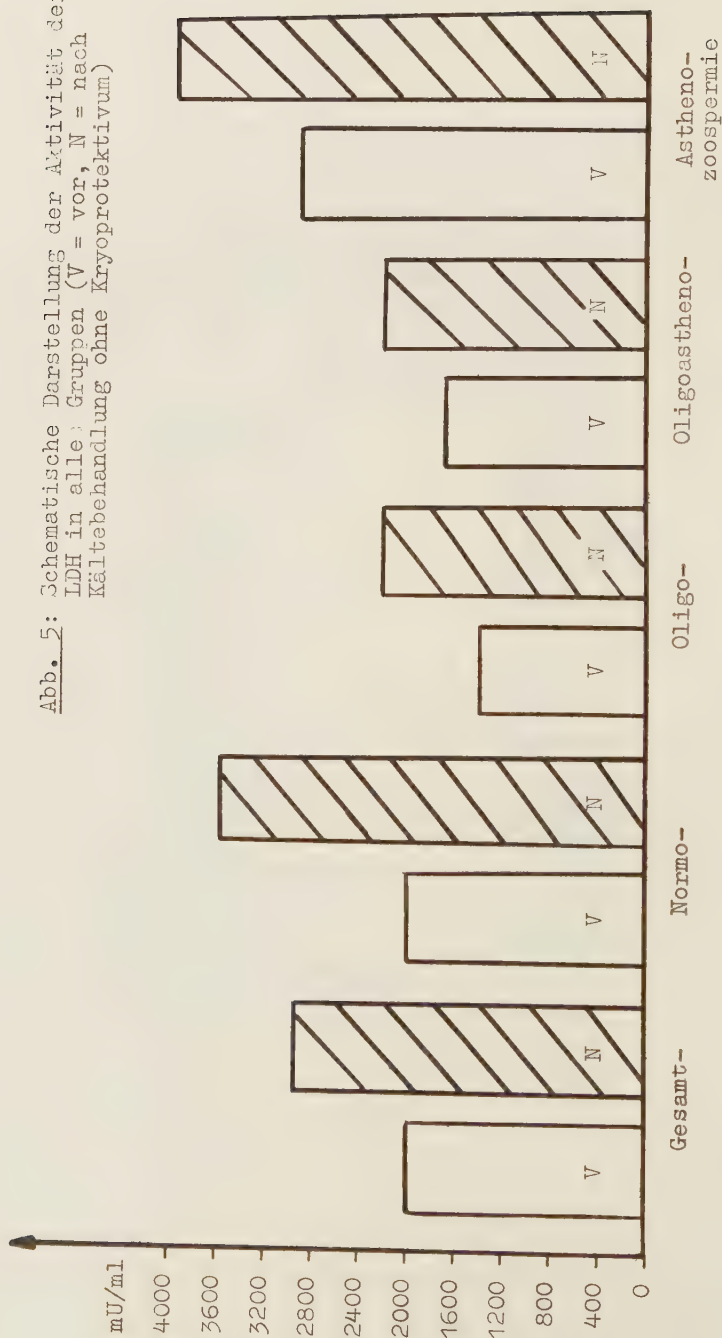
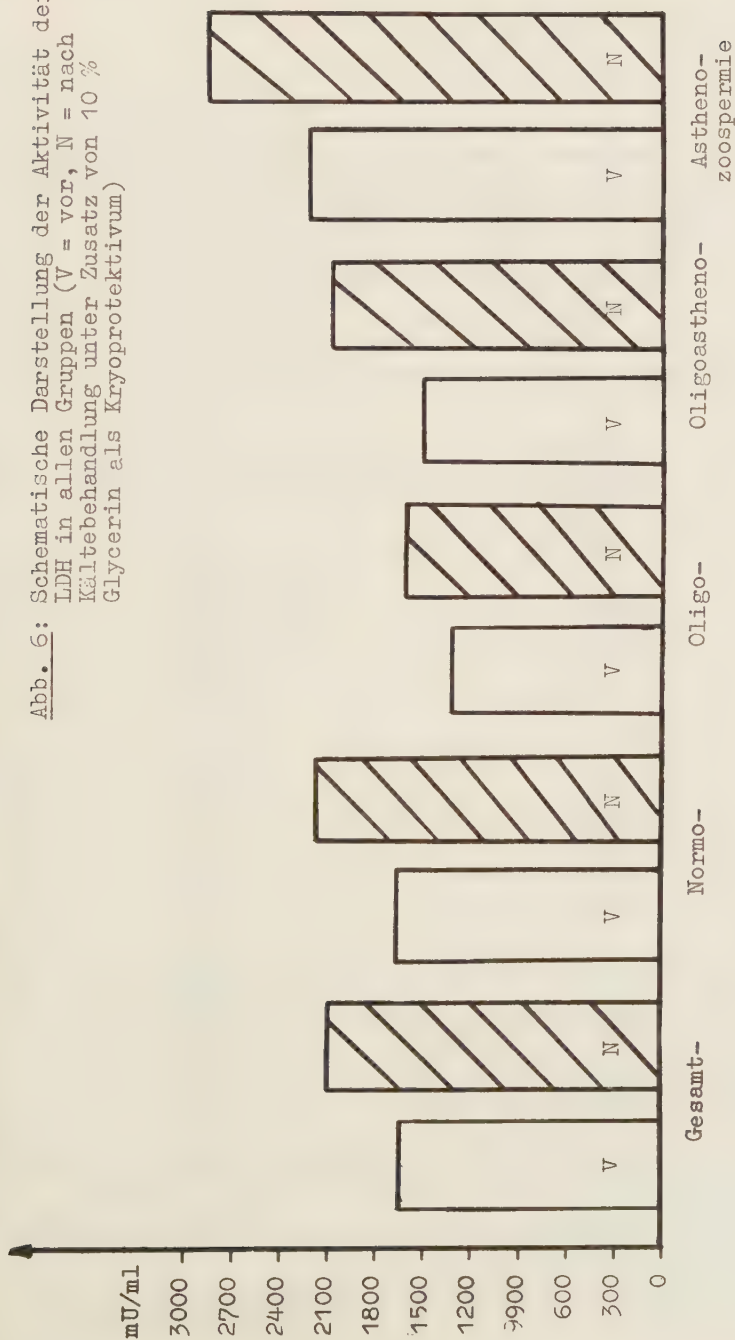


Abb. 6: Schematische Darstellung der Aktivität der LDH in allen Gruppen (V = vor, N = nach Kältebehandlung unter Zusatz von 10 % Glycerin als Kryoprotektivum)



1.4 Alkalische Phosphatase (AP)

Zur Untersuchung der Proben auf die Enzyme AP und SP gelangte nur die Vergleichsgruppe, in der die Ejakulate ohne Kryoprotektivum eingefroren wurden. Da sich in dieser Gruppe keine signifikanten Enzymzu- bzw. -abnahmen ergaben, war kein wesentlicher Anstieg der Aktivität bei Zusatz eines Kryoprotektivums zu erwarten.

Es wurden 81 Ejakulate auf ihre AP-Aktivität untersucht. Beim Nativsperma fanden sich Durchschnittswerte von 386,4 mU/ml gegenüber 377,4 mU/ml beim Kryosperma. (s. Tab. 34).

Tabelle 34: Bestimmung der AP-Aktivität bei 81 Spermaproben vor und nach Kältebehandlung ohne Kryoprotektivum.

	Enzymaktivität mU/ml	
	Nativsperma	nach Kältebehandlung - 196° C
N	81	81
$\bar{x}$	386,4	377,4
$s \pm$	284,3	267,8
$s_{\bar{x}} \pm$	31,5	29,7
$p = 0,15$		

Nicht signifikante Zunahmen der Enzymaktivität wurden in den Gruppen Normo- und Oligoasthenozoospermie verzeichnet, während in den Gruppen Oligo- und Asthenozoospermie nicht signifikante Abnahmen auftraten. (s. Tab. 35 - 38 und Abb. 7).

Zwei Proben, von denen das Seminalplasma frisch und nach Kältebehandlung mit und ohne Glycerin untersucht wurde, zeigten vor und nach dem Tiefgefrieren nur unwesentlich veränderte Enzymaktivitäten.

Der Variations-Koeffizient der Untersuchungsmethode lag bei 12,5 %.

Tabelle 35: Bestimmung der AP-Aktivität bei 27 Spermaproben mit Normozoospermie vor und nach Kältebehandlung ohne Kryoprotektivum.

Probe Nr.	Enzymaktivität mU/ml	
	Nativsperma	nach Kälte- behandlung - 196° C
102	208	464
104	164	300
105	673	673
106	655	673
107	227	173
113	182	173
114	291	155
117	273	282
118	628	637
120	209	200
121	200	218
146	327	331
147	294	304
148	313	309
149	339	356
150	298	307
151	294	305
153	328	337
154	339	346
155	326	358
158	296	304
159	348	360
161	337	348
162	314	318
163	296	301
164	328	332
170	334	341
N	27	27
$\bar{x}$	326,7	340,9
$s \pm$	128,6	133,5
$s_{\bar{x}} \pm$	24,7	25,7
$p > 0,1$		

Tabelle 36: Bestimmung der AP-Aktivität bei 20 Spermaproben mit Oligozoospermie vor und nach Kältebehandlung ohne Kryoprotektivum.

Probe		Enzymaktivität mU/ml
Nr.	Nativsperma	nach Kältebehandlung - 196° C
108	428	300
109	437	446
115	164	291
116	491	510
124	118	191
129	810	746
137	1028	1101
141	346	282
152	452	463
156	476	480
167	472	480
168	456	441
169	440	432
171	246	227
172	328	264
176	509	426
177	173	146
178	182	146
180	200	146
181	164	155
N	20	20
$\bar{x}$	396,0	383,6
$s^{\pm}$	225,3	231,8
$s_{\bar{x}}^{\pm}$	50,3	51,8
$p > 0,1$		

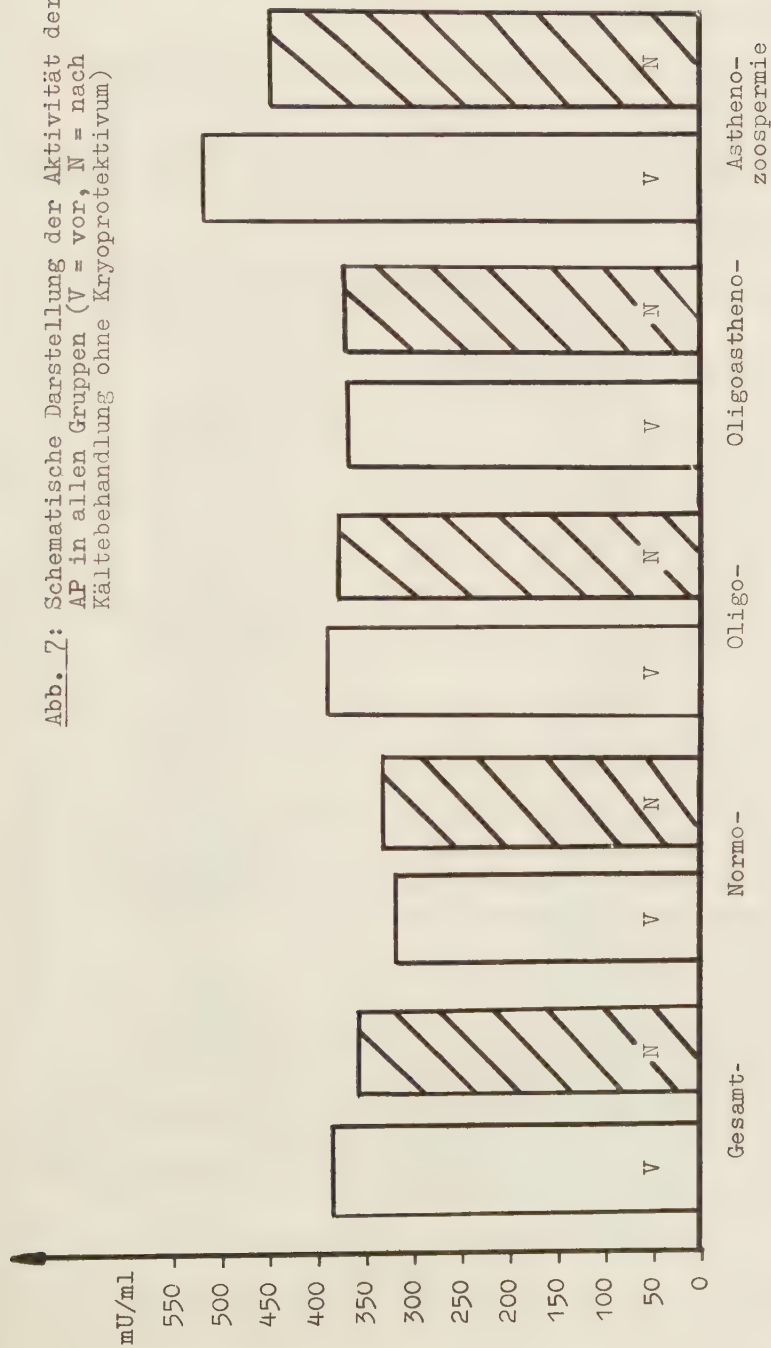
Tabelle 37: Bestimmung der AP-Aktivität bei 20 Spermaproben mit Oligoasthenozoospermie vor und nach Kältebehandlung ohne Kryoprotektivum.

Probe Nr.	Enzymaktivität mU/ml	
	Nativsperma	nach Kälte- behandlung - 196° C
103	153	309
110	218	236
111	2148	2120
112	291	291
125	117	145
127	209	200
128	473	500
130	309	300
131	237	282
132	200	237
133	282	191
134	209	219
135	528	610
136	163	200
138	355	309
139	328	245
140	328	291
142	346	309
143	182	209
144	191	182
N	20	20
$\bar{x}$	363,3	359,2
$s^{\pm}$	432,9	426,0
$s_{\bar{x}}^{\pm}$	96,8	95,2
$p > 0,3$		

Tabelle 38: Bestimmung der AP-Aktivität bei 14 Spermaproben mit Asthenozoospermie vor und nach Kältebehandlung ohne Kryoprotektivum.

Probe Nr.	Enzymaktivität mU/ml	
	Nativsperma	nach Kälte- behandlung - 196° C
101	554	691
119	200	155
122	792	764
123	255	246
126	182	164
145	619	637
157	428	431
160	436	442
165	443	428
166	435	448
173	628	328
174	1174	601
175	965	840
179	182	137
N	14	14
$\bar{x}$	520,9	450,9
$s \pm$	297,6	230,5
$s_{\bar{x}} \pm$	79,5	61,6
$p > 0,05$		

Abb. 7: Schematische Darstellung der Aktivität der AP in allen Gruppen (V = vor, N = nach Kältebehandlung ohne Kryoprotektivum)



1.5 Saure Phosphatase (SP)

Vor und nach Kryokonservierung wurden 80 Spermaproben auf ihre SP-Aktivität geprüft. Es ergaben sich durchschnittliche Werte von 642249,7 mU/ml vor und 602964,9 mU/ml nach der Kältebehandlung. Diese Abnahme war nicht signifikant ($p > 0,1$). (s. Tab. 39).

Tabelle 39: Bestimmung der SP-Aktivität bei 80 Spermaproben vor und nach Kältebehandlung ohne Kryoprotektivum.

	Enzymaktivität mU/ml	
	Nativsperma	nach Kältebehandlung - 196° C
N	80	80
$\bar{x}$	642249,7	602964,9
s $\pm$	362161,0	286282,8
$s_{\bar{x}}$ $\pm$	38254,7	32007,3
$p > 0,1$		

Außer in der Gruppe Oligoasthenozoospermie, in der sich nach dem Tiefgefrierprozeß eine Zunahme an Enzym ergab, zeigten alle übrigen Gruppen nicht signifikante Aktivitätsabnahmen. Einen Überblick geben die Tabellen 40 -43 und die Abbildung 8.

Von 2 Ejakulaten wurde das Seminalplasma frisch und nachdem es mit und ohne Kryoprotektivum tiefgefroren worden war auf seine SP-Aktivität überprüft. Es ergaben sich nur wenig veränderte Werte nach der Kältebehandlung.

Für die Methode der SP-Bestimmung ließ sich ein Variationskoeffizient von 6,3 % errechnen.

Tabelle 40: Bestimmung der SP-Aktivität bei 27 Spermaproben mit Normozoospermie vor und nach Kältebehandlung ohne Kryoprotektivum.

Probe		Enzymaktivität mU/ml
Nr.	Nativsperma	nach Kältebehandlung - 196° C
102	705990	1671550
104	484850	1051410
105	2657310	1082120
106	1076660	980710
107	439855	362085
113	511060	397940
114	490860	388850
117	110090	93930
118	498940	473690
120	954450	618120
121	872640	882740
146	770398	707200
147	810700	720840
148	830430	698390
149	760730	620350
150	690400	562490
151	794620	730410
153	692400	570000
154	600980	510100
155	840430	766800
158	796200	720580
159	850430	796300
161	760000	706400
162	798410	722340
163	776380	700480
164	810220	784100
170	89890	72680
N		27
$\bar{x}$		758348,6
s $\pm$		312464,4
s $_{\bar{x}}$ $\pm$		60133,8
p > 0,15		

Tabelle 41: Bestimmung der SP-Aktivität bei 19 Spermaproben mit Oligozoospermie vor und nach Kältebehandlung ohne Kryoprotektivum.

Probe Nr.	Enzymaktivität mU/ml	
	Nativsperma	nach Kälte- behandlung - 196° C
108	958855	521160
109	897890	753965
115	528230	445410
116	1268560	1145340
124	322290	512070
129	986265	969095
137	261590	367640
141	194930	194930
152	708360	648430
156	620400	570360
167	722150	678430
168	106050	94300
169	693365	610000
171	579740	458540
172	544390	520150
176	330270	452480
177	484800	500960
178	801940	680740
180	645390	742350
N	19	19
$\bar{x}$	613445,5	571913,1
s^+	296580,6	241317,0
$s_{\bar{x}}^+$	68040,2	55361,9
$p > 0,3$		

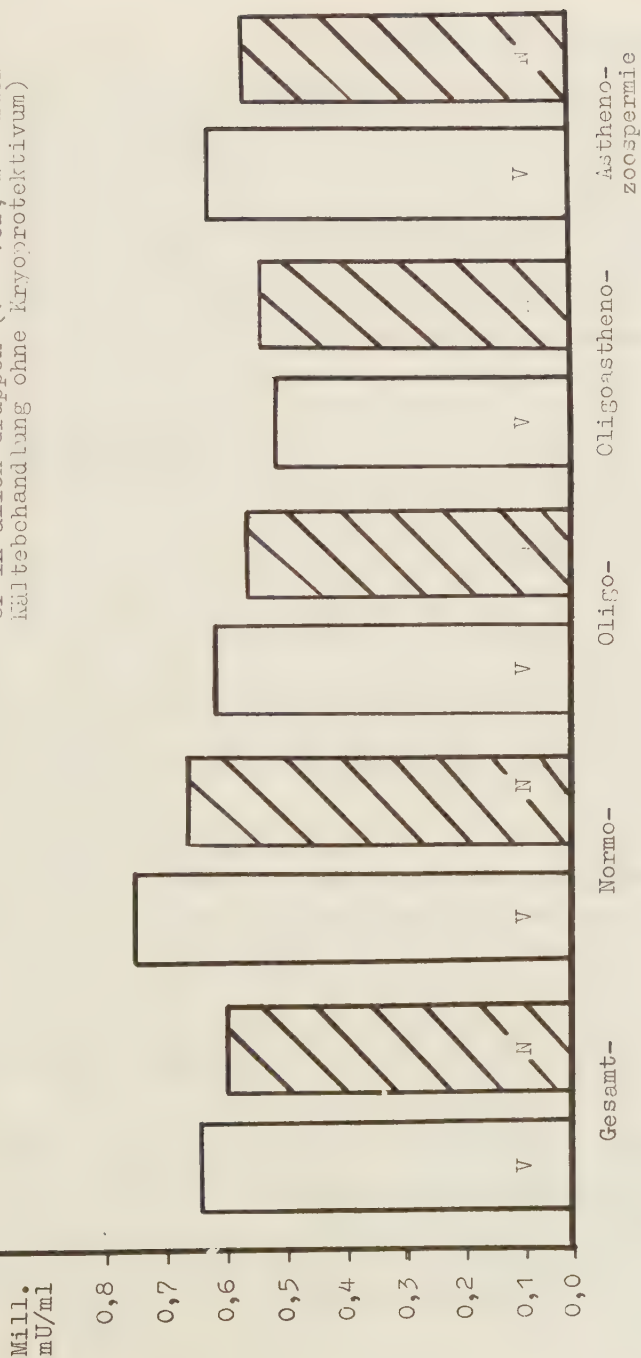
Tabelle 42: Bestimmung der SP-Aktivität bei 20 Sperma-
proben mit Oligoasthenozoospermie vor und
nach Kältebehandlung ohne Kryoprotektivum.

Probe Nr.	Enzymaktivität mU/ml	
	Nativsperma	nach Kälte- behandlung - 196° C
103	383810	1426120
110	358550	321685
111	746390	658985
112	31815	27775
125	444400	437330
127	559540	687810
128	886023	1144835
130	579740	525730
131	757500	860015
132	964550	741845
133	369660	147460
134	868600	652460
135	869610	634280
136	97970	89890
138	375720	387840
139	286840	246440
140	682760	333300
142	416120	484800
143	258560	428240
144	434390	670640
N	20	20
$\bar{x}$	519077,4	545174,0
s $\pm$	267952,0	341234,7
s $\bar{x}$ $\pm$	59915,9	76302,4
p > 0,3		

Tabelle 43: Bestimmung der SP-Aktivität bei 14 Spermaproben mit Asthenozoospermie vor und nach Kaltebehandlung ohne Kryoprotektivum.

Probe		Enzymaktivität mU/ml
Nr.	Nativsperma	nach Kältebehandlung - 196° C
101	1255430	1033230
119	412080	369660
122	494395	705990
123	503485	343400
126	781740	561560
145	505000	606000
157	650460	620800
160	638260	594800
165	642100	520850
166	703000	590400
173	477730	412080
174	580750	400970
175	656500	569640
179	566610	745380
N		14
$\bar{x}$		576768,5
s $\pm$		178795,2
s $\pm$ $\bar{x}$		47785,0
p > 0,05		

Abb. 8: Schematische Darstellung der Aktivität der JP in allen Gruppen (V = vor, N = nach Kaltebehandlung ohne Kryoprotektivum)



D. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Nach den Erfolgen der Veterinärmedizin auf dem Gebiet der Kryospermakonservierung fand die Tiefgefrierkonservierung von Sperma auch eine zunehmende Anwendung in der Humanmedizin. Vor allem war man bemüht, möglichst schonende Einfriermethoden zu entwickeln, um eine Schädigung der Spermatozoen durch den Tiefgefriervorgang so gering als möglich zu halten. Kryoschäden können dabei anhand morphologischer Parameter und biochemisch anhand bestimmter Markerenzyme objektiviert werden.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, die Schädigung menschlicher Spermatozoen durch die Kryobehandlung anhand von Enzymen zu überprüfen. Durch die Bestimmung der Fermente "Chymotrypsin-ähnliches Enzym" (CHY), Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT), Lactat-Dehydrogenase (LDH), Alkalische Phosphatase (AP) und Saure Phosphatase (SP) galt es folgende Fragen zu beantworten:

1. Läßt sich mit Hilfe bestimmter Markerenzyme eine Schädigung der Spermatozoen durch Tiefgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -196°C ohne Zusatz eines Kryoprotektivums nachweisen?
2. Läßt sich durch den Zusatz eines Kryoprotektivums der Grad der Schädigung, gemessen anhand von Markerenzymen, reduzieren und kann im Vergleich zum Ansatz ohne Kryoprotektivum eine Schutzfunktion des Glycerins objektiviert werden?
3. Lassen sich auf Grund der Enzymbestimmungen im Seminalplasma Aussagen über die Herkunft (Spermatozoen oder Seminalplasma) der Enzyme machen?
4. Bestehen Korrelationen zwischen der Enzymaktivität und pathologischen Ejakulaten?

Die Aktivitäten des Chymotrypsin-ähnlichen Enzyms wurden an 155 Ejakulaten verschiedenster Qualität bestimmt. Bei 81 Proben, die ohne Kryoprotektivum eingefroren wurden, fand sich eine nicht signifikante ($p > 0,05$) Aktivitätsminderung ($\bar{x}$ 147,1 mU/ml vor und 139,0 mU/ml nach Kryokonservierung), die bei 74 Ejakulaten unter Zusatz von 10 % Glycerin hochsignifikant ($p < 0,0005$) war ($\bar{x}$ 141,8 mU/ml vor und 130,6 mU/ml nach Kryokonservierung).

Betrachtet man die nach qualitativen Gesichtspunkten aufgeteilten Gruppen so finden sich bei denen mit Normo- und Oligozoospermie nach Kältebehandlung ohne Kryoprotektivum signifikante ($p < 0,025$), nach Glycerinzusatz hochsignifikante ($p < 0,0005$) Abnahmen des CHY (siehe Tab. 6 - 9). In den Gruppen Oligoastheno- und Asthenozoospermie waren keine signifikanten ($p > 0,05$) Aktivitätsminderungen zu verzeichnen (s. Tab. 10 - 13).

Nach der Kryokonservierung des Vollspermas war stets ein Aktivitätsabfall des "Seminins" zu beobachten. Dies wurde besonders deutlich und war in den Gruppen Normo- und Öligozoospermie hoch signifikant, wenn Glycerin als Kryoprotektivum verwendet wurde. Eine direkte Schädigung des Enzyms durch die Kältebehandlung konnte in 8 Versuchen ausgeschlossen werden (s. Tab. 5a). Zur Untersuchung gelangte nur das Seminalplasma, in dem frisch und nach der Kryokonservierung ohne und mit Glycerin der Seminingehalt bestimmt wurde. Es zeigten sich nur unauffällige Aktivitätszu- bzw. -abnahmen. Eine Labilität des Enzyms gegenüber tiefen Temperaturen konnte somit ausgeschlossen werden.

Der Abfall der Enzymaktivität beim Vollsperma nach der Kältebehandlung ließe sich wie folgt interpretieren:

Durch den Tiefgefriervorgang werden, insbesondere unter Verwendung von Glycerin, Substanzen aus den Spermatozoen freigesetzt, die einen Hemmstoff für das Semin in darstellen. Bislang ist ein solcher Hemmstoff nicht be-

kannt, es könnte sich um Phospholipide handeln. Bei Freisetzung dieses theoretischen "Hemmstoffes" könnte es zu einer Komplexbildung dieses Stoffes mit dem Semin in kommen. Ein Aktivitätsabfall des Enzyms wäre die Folge.

Eine andere Möglichkeit, die Enzymabnahme zu erklären, besteht darin, daß auf Grund einer erhöhten Permeabilität der Zelloberfläche durch den Tiefgefriervorgang ein Teil des Semins in die Spermatozoen eindringt und somit biochemisch nicht aktiv ist. Andererseits könnte auch durch eine Alteration der Zellmembran infolge der Kryokonservierung mehr Semin an die Spermatozoenoberfläche adsorbiert werden. Das hieße, daß der Enzymverlust in spermatozoenreichen Ejakulaten höher sein müßte, als in solchen mit einer Oligozoospermie. Im vorliegenden Fall konnte dies jedoch nicht bestätigt werden. Die Aktivitätsabnahmen waren gerade bei den Proben mit einer Oligozoospermie höher als bei den spermatozoenreichen Proben. Lediglich in der Gruppe Normozoospermie mit Glycerinzusatz war ein Enzymverlust nach dem Tiefgefrieren von 29,8 % gegenüber dem Nativsperma zu beobachten.

Es kann festgestellt werden, daß die enzymatische Aktivität des "Chymotrypsin-ähnlichen Enzyms" durch den Tiefgefriervorgang eine geringe Schädigung erfährt. Da dem Semin bei der Spermaverflüssigung und bei der Zervix-Mukos-Penetration eine unterstützende Rolle zukommen soll, bedeutet eine Aktivitätsminderung dieses Enzyms durch die Kryobehandlung eine zusätzliche Minderung der Spermaqualität.

Im Falle des Semins ist anzunehmen, daß dieses Enzym im wesentlichen aus dem Seminalplasma stammt. Nach ZANEVELD et al. wird es in Split-Ejakulaten hauptsächlich in der 1. Fraktion nachgewiesen, was auf seine Prostataherkunft schließen läßt (123).

Gesicherte Abhängigkeiten des CHY-Gehalts zu pathologischen Ejakulaten ließen sich nicht aufstellen.

Auf ihren Gehalt an Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) wurden insgesamt 154 Ejakulate untersucht, wobei 81 ohne und 73 mit Kryoprotektivum tiefgefroren wurden. In allen Gruppen waren mehr oder weniger große Enzymzunahmen nach der Kältebehandlung zu verzeichnen, die sich statistisch als hoch signifikant erwiesen. Da die GOT nicht nur von der Prostata gebildet wird, sondern auch in den Mitochondrien der Mittelstücke der Spermatozoen enthalten ist (34,64,79), zeigt eine Zunahme der Enzymaktivität im Seminalplasma nach dem Einfriervorgang eine Strukturschädigung der Mittelstücke der Spermatozoen an. Daß die Schädigung beträchtlich sein kann, zeigen die im Seminalplasma gemessenen Aktivitätssteigerungen der GOT von 27,6 % bis zu 97,3 % je nach Ejakulatgruppe gegenüber dem Nativsperma. Der letztere Wert wurde bei 14 Ejakulaten mit Asthenozoospermie gefunden, die ohne Kryoprotektivum eingefroren wurden.

Anhand der gefundenen Werte läßt sich zweifelsfrei der protektive Charakter des Glycerins erkennen. Bei 81 Ejakulaten, die ohne Kryoprotektivum eingefroren wurden, war eine Enzymzunahme von 58,7 % während des Tiefgefriervorgangs im Seminalplasma zu verzeichnen, während sie bei 73 mit Glycerin behandelten Proben bei 38,3 % lag.

Beziehungen der GOT-Aktivität zu anderen Parametern des menschlichen Ejakulats ließen sich kaum aufstellen. Eine Korrelation, wie sie von FLIPSE (23) 1960 gefunden wurde, indem er feststellte, daß beim Bullen mit steigender Spermatozoenzahl der Gehalt an GOT steigt, trifft für das Humansperma nur bedingt zu. In spermatozoenarmen Ejakulaten (Oligozoospermie) war der GOT-Gehalt am niedrigsten. Über die Gruppen Oligoasthenö-, Normo- bis hin zur Asthenozoospermie nahmen die Werte zu. Letztere verzeichneten mit 186,1 mU/ml bzw. 196,0 mU/ml GOT die höchsten Aktivitätsgrade. Es ist

zu vermuten, daß bei einer Asthenozoospermie bereits eine Schädigung der Spermatozoen vorliegt, die sich nicht nur in einer verminderten Motilität, sondern auch durch einen erhöhten Austritt intrazellulärer Enzyme darstellt. Diese Beziehung konnte jedoch statistisch nicht gesichert werden.

RUSKOVA et al. (83) fanden bei Oligoasthenozoospermie die höchsten Transaminaseaktivitäten, während sie bei JOEL et al. (48) von den Ejakulaten mit Normo- über die mit Hypo-, Oligo- bis hin zu denen mit Azoo- und Aspermie abnahmen. Im Gegensatz hierzu bewiesen DOHRMANN et al. (17), daß die in pathologischen Ejakulaten gefundenen Werte nur unwesentlich von denen bei einer Normozoospermie abweichen. Eine differentialdiagnostische Abgrenzung pathologischen Spermas mit Hilfe der GOT-Aktivität halten sie für nicht möglich.

Die Lactat-Dehydrogenase wird dem zytoplasmatischen Raum zugeordnet (34/64,121). Sie ist überwiegend in den Spermatozoen aktiv, ein Teil soll aus der Prostata stammen (68). Eine Aktivitätszunahme dieses Ferments im Seminalplasma nach der Kryobehandlung ist somit als Schädigung der Spermatozoen zu werten.

Bei insgesamt 154 auf ihren LDH-Gehalt untersuchten Ejakulaten ergaben sich hoch signifikante ($p < 0,0005$) Enzymzunahmen nach dem Tiefgefriervorgang. War bei der Kältebehandlung ohne Kryoprotektivum eine Aktivitätszunahme von 48,2 % zu verzeichnen, so lag diese bei Verwendung von Glycerin bei nur 28,2 %. Dies zeigt wiederum die protektive Wirkung des Glycerins.

Die deutliche Aktivitätssteigerung nach dem Kryoverfahren beweist, daß Enzym aus den Spermatozoen, die durch den Tiefgefriervorgang eine Schädigung erfuhren, freigesetzt wurde und somit überwiegend in diesen biochemisch aktiv ist. Die nahezu gleichgroße Enzymzunahme von etwa 27 % nach der Kältebehandlung in

der Gruppe Asthenozoospermie mit und ohne Kryoprotektivum zeigt, daß bei vorgeschädigten Spermatozoen bereits Enzym in das Seminalplasma übergetreten ist und nach der Kryobehandlung nicht mit einem weiteren Enzymverlust zu rechnen ist. Bereits die hohe Aktivität des Spermaliquors beim Nativsperma (2323 mU/ml und 3081 mU/ml) weist auf die Vorschädigung der Spermatozoen in dieser Gruppe hin.

Zusammenhänge der LDH-Aktivität mit anderen Parametern des Humanspermas lassen sich ebenso wie im Falle der GOT kaum aufstellen. Auch hier wurden die geringsten Aktivitäten in der Gruppe Oligozoospermie gemessen, während der Enzymgehalt über die Ejakulate mit Normo-, Oligoastheno- bis hin zu denen mit Asthenozoospermie zunahm. In Hinsicht auf die andrologische Diagnostik erweist sich die Bestimmung der LDH als wenig aussagekräftig, was auch mit der Literatur übereinstimmt (17,19,32).

Bei der Bestimmung der Aktivitäten der Alkalischen und Sauren Phosphatase vor und nach Kryobehandlung wurde auf die Untersuchungen in Anwesenheit eines Kryoprotektivums verzichtet. Sowohl bei der Gesamtzahl der auf AP untersuchten Ejakulate als auch in den einzelnen Gruppen konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede der Enzymaktivität nach der kryobiologischen Behandlung gemessen werden. Gleiche Ergebnisse fanden sich bei den SP-Messungen. Beide Fermente entstammen im wesentlichen dem Seminalplasma.

Für die Fertilitätsdiagnostik oder als Gradmesser einer Schädigung des Ejakulats nach der Kryokonservierung erscheinen beide Enzyme ungeeignet (18, 34, 54, 71, 73, 80, 83). Die SP ist in der andrologischen Diagnostik nur insofern verwertbar, als sie mit Er-

reichen der Pubertät ansteigt und auch mit dem Testosterongehalt korreliert. Sie ist somit als sekundäres Geschlechtsmerkmal anzusehen (21,36,38,51,64).

Bei der Betrachtung der Ergebnisse der untersuchten Enzyme zeigt sich, daß sich lediglich die GOT und die LDH für die Diagnose einer Kryoschädigung der Spermatozoen eignen. GRAHAM und PACE (30) konnten 1967 am Bullensperma nach der Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff einen Anstieg dieser Fermente nachweisen. Ihnen erschien ihre Bestimmung wichtig, um den Grad einer Zellschädigung nach dem Einfrieren aufzuzeigen. Auch BROWN et al. (11) bezeichnen die Messung der GOT-Aktivität nach der Kryobehandlung als "besten Indikator einer Zellschädigung".

Die GOT und die LDH, als Enzyme des zytoplasmatischen Raums und der Mitochondrien werden immer dann frei, wenn eine Schädigung der Plasmamembran oder intra-zytoplasmatischer Strukturen eintritt. Derartige Schädigungen durch den Tiefgefriervorgang an der Plasmamembran und der Akrosomenkappe wurden beschrieben (72,91,92,93). Bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen an Kryosperma wurden durch SHERMAN Veränderungen an den Mitochondrien und am endoplasmatischen Retikulum der Spermatozoen festgestellt (103,107).

Die Untersuchung der Enzyme "Chymotrypsin-ähnliches Enzym", alkalische und saure Phosphatase zur Diagnostik etwaiger Kryoschäden der Spermatozoen ist ungeeignet. Sie stammen im wesentlichen aus dem Spermaliquor und sind daher für eine Schädigung der Spermatozoen nicht repräsentativ. Eine Bestimmung der Enzyme GOT und LDH für die Routinediagnostik ist zu diskutieren. Sie könnten auch bei Nativsperma eine Qualitätsminderung in Form einer Zellschädigung aufzeigen.

Durch den Tiefgefriervorgang in flüssigem Stickstoff bei -196°C war eine Abnahme der CHY-Aktivität im Seminalplasma zu verzeichnen. Die Werte der alkalischen und sauren Phosphatase zeigten nach dem Tiefgefriervorgang keine Veränderungen. Bei der Untersuchung der Ejakulate auf ihren Gehalt an GOT und LDH ergaben sich nach der Kryobehandlung hoch signifikante Enzymzunahmen im Seminalplasma, die als Indikator einer Spermatozoenschädigung zu werten sind.

Anhand der Aktivitätsbestimmung der GOT und LDH im Seminalplasma in Anwesenheit eines Kryoprotektivums konnte die Schutzfunktion von 10 %igem Glycerin während der Kryobehandlung nachgewiesen werden. So waren nach dem Tiefgefrieren der Spermaproben ohne Kryoprotektivum Aktivitätszunahmen der GOT von 58,7 % und der LDH von 48,2 % zu messen, während in Anwesenheit von 10 % Glycerin solche von 38,3 % bzw 28,2 % gemessen wurden.

Im Falle des CHY waren nach der Kältebehandlung; Abnahmen des Enzymgehalts zu beobachten. Es kann vermutet werden, daß ein Teil dieses Enzyms von einem theoretischen Hemmstoff, der bei der Kältebehandlung aus den Spermatozoen frei wird, gebunden wird. Auf Grund einer erhöhten Permeabilität der Spermatozoenoberfläche bzw. einer Alteration der Zellmembran durch den Tiefgefriervorgang könnte Enzym in die Spermatozoen eindringen oder vermehrt an deren Oberfläche adsorbiert werden.

Die Abnahme der CHY-Aktivität nach der Kryobehandlung weist darauf hin, daß dieses Enzym nur im Spermaliquor vorkommt und nicht aus den Spermatozoen stammt. Eine Zellzugehörigkeit hätte bei der gesicherten Zellschädigung durch den Tiefgefriervorgang ein Freiwerden

und damit eine Aktivitätszunahme dieses Ferments im Seminalplasma bewirken müssen. Gleiches dürfte für die AP- und SP-Aktivitäten gelten. Schließlich sprechen die hoch signifikanten Zunahmen der GOT- und LDH-Aktivität nach der Kryokonservierung eindeutig für die vorwiegende Herkunft dieser Enzyme aus den Spermatozoen selbst.

Wesentliche Korrelationen zwischen der Aktivität der untersuchten Enzyme und anderen Parametern des menschlichen Spermas, insbesondere bei pathologischen Ejakulaten konnten nicht gefunden werden. Bei den Untersuchungen zum GOT- und LDH-Gehalt konnte eine Zunahme der Fermentaktivitäten von der Oligo- über die Normo- und Oligoastheno- bis hin zur Asthenozoospermie festgestellt werden.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Die enzymatische Aktivität verschiedener Enzyme im Seminalplasma wurde vor und nach der Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff bei -196°C untersucht. Eine Schädigung der Spermatozoen durch den Tiefgefriervorgang sollte anhand des Enzymmusters von 5 Fermenten objektiviert werden. Die Ejakulatproben wurden nach qualitativen Gesichtspunkten in Gruppen mit Normo-, Oligo-, Oligoastheno- und Asthenozoospermie unterteilt. Bei 81 Proben wurde vor und nach dem Tiefgefrieren ohne Zusatz eines Kryoprotektivums die Aktivität der Seminalplasmaenzyme "Chymotrypsin-ähnliches Enzym" (CHY), alkalische (AP) und saure (SP) Phosphatase und die der Zellmarkerenzyme Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) und Lactat-Dehydrogenase (LDH) bestimmt. Außerdem wurde bei 90 Proben unter Verwendung von 10 % Glycerin als Kryoprotektivum die CHY-, GOT- und LDH-Aktivität vor und nach der Kryobehandlung im Seminalplasma gemessen.

Bei der Bestimmung der CHY-Aktivität war in allen Ejakulatgruppen, die ohne Kryoprotektivum behandelt wurden, eine statistisch unauffällige Abnahme der Enzymaktivität zu verzeichnen. Sie betrug 3,4 % gegenüber dem Nativsperma. In Anwesenheit von 10 % Glycerin wurde ein Aktivitätsverlust von 17,6 % beobachtet, der sich statistisch als hoch signifikant erwies. Die Komplexbildung des CHY mit einem theoretischen Hemmstoff oder eine Permeabilitätssteigerung bzw. Alteration der Spermatozoenmembranen wird diskutiert, die zu einer vermehrten Adsorption des Enzyms führen könnten. Es wird vermutet, daß das Enzym im wesentlichen aus dem Seminalplasma stammt. Korrelationen der Enzymaktivität zu pathologischen Ejakulaten konnten nicht festgestellt werden.

Bei der Bestimmung der Zellmarkerenzyme GOT und LDH fanden sich nach dem Tiefgefrieren mit und ohne Kryoprotektivum hoch signifikante Aktivitätszunahmen im Seminalplasma.

Ohne Kälteschutzmittel lag die GOT-Aktivität im Seminalplasma um 58,7 % und die der LDH um 48,2 % höher, während beide Enzyme nach Glycerinzusatz nur um 38,3 % bzw. 28,2 % anstiegen. Der kryoprotektive Charakter des Glycerin konnte somit mit Hilfe biochemischer Parameter objektiviert werden.

Die Zunahme der biochemischen Aktivität beider Enzyme im Seminalplasma nach dem Tiefgefrieren deutet auf deren Herkunft aus den Spermatozoen hin, aus denen sie durch die Kryoschädigung freigesetzt wurden.

Die Enzymaktivitäten der GOT und LDH nahmen von der Oligo- über die Normo- und Oligoastheno- bis hin zur Asthenozoospermie zu.

Bei der Untersuchung der Ejakulatproben auf ihren Gehalt an alkalischer und saurer Phosphatase fanden sich nur geringgradige Aktivitätsveränderungen, die im Rahmen der Schwankungsbreite der Bestimmungsmethoden lagen. Beide Enzyme scheinen nur im Seminalplasma aktiv zu sein. Korrelationen der Enzymaktivität zu anderen Parametern des menschlichen Spermas konnten nicht aufgestellt werden.

Zur Qualitätsbestimmung von Kryosperma eignen sich daher aufgrund der vorliegenden Untersuchungsergebnisse die Zellmarkerenzyme GOT und LDH, wobei die Größe der Aktivitätszunahme der Enzyme ein Maß für den Grad der Zellschädigung der Spermatozoen nach der Kryokonservierung ist.

SUMMARY

The activity of 5 seminal plasma enzymes was investigated before and after semen preservation in liquid nitrogen (-196°C). A possible cryoinjury of the spermatozoa might be objectified using marker enzymes. Semen samples were classified according to qualitative aspects into groups of normo-, oligo-, oligoastheno- and asthenozoospermia. 81 samples were analysed before and after freezing without a cryoprotective agent for the following enzyme activities: "Chymotrypsin-like enzyme" (CHY), glutamic-oxalacetic-transaminase (GOT), lactic-dehydrogenase (LDH), alkaline (AP) and acid (3P) phosphatase. Furthermore the activity of CHY, GOT and LDH was determined in 90 semen samples using 10 % glycerol for cryoprotection.

Compared to fresh semen, CHY activity in frozen semen samples without glycerol protection showed a decrease of the enzyme activity of 3,4 %. In the presence of 10 % glycerol a loss of enzyme activity of 17,6 % was determined, which was statistically significant. The binding of the enzyme to an inhibitor or an increased permeability of the spermatozoal membrane is discussed, which may cause an increased membrane adsorption of the enzyme.

It is supposed that the enzyme comes only from seminal plasma. Correlations of the enzyme activity in seminal plasma to pathological ejaculates could not be determined.

Quantitative determination of the cell marker enzymes GOT and LDH after freezing with and without a cryoprotective agent showed a highly significant increase of enzyme activities in the seminal plasma. Without cryoprotection the GOT activity in seminal plasma was increased to 58,7 % and that of LDH to 48,2 %.

Using glycerol the increase of enzyme activity of both enzymes was 38,3 % for GOT and 28,2 % for LDH. The cryoprotective nature of glycerol could be demonstrated using biochemical parameters.

The increase of both enzymes after cryopreservation indicates their origin of the spermatozoa. The enzyme activities increased from oligo- to normo- and oligo-astheno- to asthenozoospermia.

The analysis of alkaline and acid phosphatase activity in the semen samples showed no change of activities. Both enzymes seem to be active in seminal plasma only. There could not be found any correlation of the enzyme activity to other parameters of the human ejaculate.

The results indicate that the determination of the cell marker enzymes GOT and LDH is suitable for quality control of frozen semen. The activity increase of these marker enzymes in seminal plasma after the process of cryopreservation goes parallel to the amount of cell damage occurring after freeze preservation.

F. LITERATURVERZEICHNIS

1. Ackerman, D.R.: The effect of cooling and freezing on the aerobic and anaerobic lactic acid production of human semen. *Fertil. Steril.*, 19, 123-128 (1968)
2. Ackerman, D.R.: Hyaluronidase in human semen and sperm suspensions subjected to temperature shock and to freezing. *J. Reprod. Fertil.*, 23, 521-523 (1970)
3. Ackermann, D.R.: Variation due to freezing in the citric acid content of human semen. *Fertil. Steril.*, 22, 58-60 (1971)
4. Behrman, S.J.: Preservation of human sperm by liquid nitrogen vapor freezing. In: *Current Problems in Fertility* edit. by A. Ingelman-Sundberg and N.O. Lunell, p. 10-16 Plenum Press, New York - London 1971
5. Behrman S.J. and D.R. Ackerman: Freeze preservation of human sperm. *Amer. J. Obstet. Gynec.*, 103, 654-661 (1969)
6. Behrman, S.J. and Y. Sawada: Heterologous and homologous inseminations with human semen frozen and stored in a liquid-nitrogen refrigerator. *Fertil. Steril.*, 17, 457-466 (1966)
7. Bergmeyer, H.U.: *Methoden der Enzymatischen Analyse* 2. Auflage, Band I 1970 Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße
8. Bessy, O., O. Lowry and M. Brock: A method for the determination of alkaline phosphatase with 5 micro-liters of serum. *J. Biol. Chem.*, 164, 321-329 (1946)
9. Blanco, A. and W.H. Zinkham: Lactat dehydrogenase in human testes. *Science*, 139, 601-602 (1963)
10. Blom, E.: A one-minute live-dead sperm stain by means of eosin-nigrosin. *Fertil. Steril.*, 1, 176-177 (1950)

11. Brown, K.I., B.G. Some factors affecting loss of intra-cellular enzymes from spermatozoa. Crabo, E.F. Graham and M.M. Pace: Cryobiology, 8, 220-224 (1971)
12. Bunge, R.G., W.C. Clinical use of frozen semen; report of 4 cases. Keettel and J.K. Sherman: Fertil.Steril., 2, 520-529 (1954)
13. Bunge, R.G. and Fertilizing capacity of frozen human semen. J.K. Sherman: Nature (London), 172, 767-768 (1953)
14. Clausen, J. and Lactate dehydrogenase isoenzymes of B. Ølvisen: human semen. Biochem. J., 97, 513-515 (1965)
15. Cohen; Kaden; zit. Schill, W.-B.: Rieben; Sherman; Humane Spermakonservierung und Sillo-Seidl; Sokol: therapeutische Ausblicke. Der Hautarzt, 23, 525-530 (1972)
16. Deminatus, F.: Fortschritt in der Sperma-Tiefkühltechnik (-79°C) durch ein halbautomatisches Einfriergerät. Dt. Tierärztl. Wchsch., 66, 466-469 (1959)
17. Dohrmann, R.F., Untersuchungen über das Verhalten der R. Doepfner und Glutamat-Oxalat-Transaminase, Glutamat-Pyruvat-Transaminase, Lactat-Dehydrogenase und Aldolase im menschlichen Spermaliquor. H.J. Uhles: Arch. klin. exp. Derm., 225, 67-73 (1966)
18. Eliasson, R.: Correlation between the sperm density, morphology and motility and secretory function of the accessory, genital glands. Andrologie, 2, 165-169 (1970)
19. Eliasson, R., Lactate dehydrogenase in human K. Häggman and seminal plasma. B. Wiklund: Scand. J. Clin. Lab. Invest., 20, 353-359 (1967)
20. Elstein, M., Cervical mucus in human reproduction. K.S. Moghissi and R. Borth: Scriptor Verlag, Kopenhagen 1973

21. Engberg, H., E.S. The possibility of determining
Anderson, B. Sury androgen production by measuring
and J. Raft: the acid phosphatase in semen.
 Investigations on cryptorchid
 patients.
 J. Endocr., 5, 42-45 (1947)
22. Fernandez-Cano, L., Refrigerant preservation of human
M.F. Menkin, C.R. spermatozoa. I. Factors influencing
Garcia and J. Rock: recovery in euspermic semen:
 clinical applications.
 Ferti. Steril., 15, 390-406 (1964)
23. Flipse, R.J.: Metabolism of bovine semen.
 IX. Glutamic-oxalacetic and
 glutamic-pyruvate transaminase
 activity.
 J. Dairy.Sci., 43, 773-776 (1960)
24. Förg-Brey, B.: Persönliche Mitteilung, Juni 1974
25. Forgason et al.; zit. Schill, W.-B.:
Herman and Madden; Humane Spermakonservierung und
Rohloff; Schmidt; therapeutische Ausblicke.
Wales und O'Shea; Der Hautarzt, 23, 525-530 (1972)
Lightfort und Sala-
mon:
26. Fritz, H., M. Arn- Verhalten der "Chymotrypsin-ähnlichen"
hold, B. Förg-Brey, Proteinase aus Humansperma gegenüber
L.J.D. Zaneveld und Protein-Proteinase-Inhibitoren.
G.F.B. Schumacher: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.
 352, 1651-1653 (1972)
27. Fritz, H., B. Förg- Humanakrosin: Gewinnung und Eigen-
Brey, E. Fink, M. schaften.
Meier, H. Schiess- Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.
ler und C. Schirren: 352, 1943-1949 (1972)
28. Gleichen- Russworm zit. Schirren, C.:
von; Hunter; Lode: Fertilitätsstörungen des Mannes.
 Beiträge zur Sexualforschung
 Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart 1961
29. Goldberg, E.: Lactic and malic dehydrogenases in
 human spermatozoa.
 Science, 139, 602-603 (1963)

30. Graham, E.F. and M.M. Pace: Some biochemical changes in spermatozoa due to freezing. *Cryobiology*, 4, 75-84 (1967)
31. Gray, S. and C.H. Huggins: Electrophoretic analysis of human semen. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 50, 351-353 (1942)
32. Gregoire, A.T. and M.J. Moran: The lactic dehydrogenase, glucose phosphate isomerase, fructose, and protein content of pre- and postvasectomy necrospermic and azoospermic human seminal plasma. *Fertil. Steril.*, 23, 708-711 (1972)
33. Gregoire, A.T. and M.J. Moran: The enzyme activity, protein and fructose content of normal, oligospermic, postvasectomy, and infertile azoospermic men. *Fertil. Steril.*, 24, 208-211 (1973)
34. Gregoire, A.T. M.J. Moran and A. Cuadros: Activity and localization of isocitric dehydrogenase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, alkaline and acid phosphatase of the human vas deferens. *Fertil. Steril.*, 24, 309-313 (1973)
35. Gregoire, A.T., A.E. Rakoff and K. Ward: Glutamic oxalacetic transaminase in semen of human, bull and rabbit seminal plasma. *Int. J. Fertil.*, 6, 73-76 (1961)
36. Gutman, A.B. and E.B. Gutman: Acid phosphatase and functional activity of the prostate (man) and preputial glands (rat). *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 39, 529-532 (1938)
37. Gutman, A.B. and E.B. Gutman: Quantitative relations of a prostatic component (acid phosphatase) of human seminal fluid. *Endocrinology*, 28, 115-118 (1941)

38. Gutman, A.B. and E.B. Gutman: zit. Mann, T.:
The biochemistry of semen and of the male reproductive tract.
Methuen and Co. Ltd., London 1964
39. Haller; Ham; Kölliker; Leeuwenhoek; von Leydig; Sertoli; Spallanzani: zit. Joel, C.A.:
Studien am menschlichen Sperma
2. Auflage
Benno Schwabe Verlag, Basel 1953
40. Heinke, E. und R. Doepfmer: Fertilitätsstörungen beim Manne.
In Jadassohn's Handbuch der Haut- und Geschlechtskrankheiten Erg. Werk Band VI/3 herausgegeben von H. Schuermann und R. Doepfmer
Springer Verlag
Berlin-Göttingen-Heidelberg 1960
41. Hoagland, H. and G. Pincus: Revival of mammalian sperms after immersion in liquid nitrogen.
The J. Gen. Physiol.
25, 337-339 (1942)
42. Huggins, C.B. and C. Johnson: Chemical observations on fluids of the seminal tract.
Amer. J. Physiol., 103, 574-578 (1933)
43. Iizuka, R. and Y. Sawada: Successful inseminations with frozen human semen.
Japan. J. Fertil. Steril.
3, 1-4 (1958)
44. Ishibe, T., H. Nihira, T. Kadotani and K. Ohama: Enzyme activities in the seminal plasma of patients with sex-chromosome abnormalities.
Fertil. Steril., 22, 774-777 (1971)
45. Ivanov, E.E.: Zur Frage der Energetik der Spermatozoenbewegung.
Z. Zücht. B., 20, 404-406 (1931)
46. Jahnel, F.: Über die Widerstandsfähigkeit von menschlichen Spermatozoen gegenüber starker Kälte.
Klin. Wochenschrift, 17, 1273-1274 (1938)

47. Joel, C.A.: Studien an menschlichen Sperma.
2. Auflage
Benno Schwabe Verlag, Basel 1953
48. Joel, C.A. and M. Herzberg: Glutamic-oxaloacetic transaminase in human semen and reproductive organs.
J. Reprod. Fertil., 10, 185-188 (1965)
49. Karmen, A.: A note on the spectrophotometric assay of glutamic-oxaloacetic-transaminase in human blood serum.
J. Clin. Invest., 74, 131-133 (1955)
50. Keettel, W.C., R.G. Bunge, J.T. Bradbury and W.O. Nelson: Report of pregnancies in infertile couples.
The Amer. J. Med. Ass. 160, 102-105 (1956)
51. Kent, J.R., B.V. Suryanaryana and M. Hill: Sex hormone effect upon acid phosphatase content of human seminal and prostatic fluid.
Invest. Urol., 7, 250-256 (1969)
52. Kimmig, J., O. Steeno und C. Schirren: Ergebnisse der modernen biochemischen Forschungen auf dem Gebiet der Andrologie.
Internist, 8, 25-34 (1967)
53. Kipping, D.: Transaminasen im menschlichen Ejakulat.
Z. Haut-Geschl. Kr., 45, 201-206 (1969)
54. Kipping, D.: Über die Phosphatasen des menschlichen Samens.
Clin. Chim. Acta, 33, 409-413 (1971)
55. Klenner, A.: Enzymatische und morphologische Auswirkung der Tiefgefrierung auf das akrosomale System von Eberspermien.
Zuchthygiene, 9, 71 (1974)
56. Kurzrock, R. und E.G. Miller: zit. Schill, W.-B.: Die Bedeutung der Proteasen des männlichen Genitaltraktes für die Fortpflanzung.
Med. Welt, 26, 1450-1453 (1975)

57. Kutscher, W. und
H. Wolbergs: Prostataphosphatase.
Z. Physiol. Chem., 236, 237-239
(1935)
58. Landau, R.L. and
R. Loughhead: Seminal fructose concentration as
an index of androgenic activity
in man.
J. Clin. Endocrin., 11, 1411-1412
(1951)
59. Lea, C.H. and
J.C. Hawke: Lipovitellin.
2. The influence of water on the
stability of lipovitellin and the
effects of freezing and drying.
Biochem. J., 52, 105-108 (1952)
60. Lovelock, J.E.: Denaturation of lipid-protein
complexes as a **cause** of damage
by freezing.
Proc. Roy. Soc. Biol.
147, 427-433 (1957)
61. Lundquist, F.,
T. Thorsteinsson
and O. Buus: Purification and properties of
some enzymes in human seminal plasma.
Biochem. J., 59, 69-79 (1955)
62. Mann, T.: The origin and function of seminal
fructose.
Biochem. J., 40, 29-32 (1946)
63. Mann, T.: The biochemistry of semen.
Methuens Monographs on Biochemical
Subject.
London 1954
64. Mann, T.: The biochemistry of semen and of
the male reproductive tract.
Methuen and Co. Ltd., London 1964
65. Mann, T. and
U. Parsons: zit. Schirren, C.:
Fertilitätsstörungen des Mannes.
Beiträge zur Sexualforschung.
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart 1961
66. Mantegazza, P.: zit. Schill, W.-B.:
Humane Spermakonservierung und
therapeutische Ausblicke.
Der Hautarzt, 23, 525-530 (1972)

67. Metheson, G.,
L. Carlborg
and C. Gemzell: Frozen human semen for arti-
ficial insemination.
Amer. J. Obstet. Gynec.
104, 495-501 (1969)
68. McLeod, J. and
F. Wroblewski: Lactic dehydrogenase activity
in human semen.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med.
99, 265-267 (1958)
69. Moghissi, K.S.,
D. Dabich,
J. Levine and
O.W. Neuhaus: Mechanism of sperm migration.
Fertil. Steril., 15, 15-23 (1964)
70. Moghissi, K.S.
and F.N. Syner: The effect of seminal proteinase
on sperm migration through cer-
vical mucus.
Int. J. Fertil., 15, 43-49 (1970)
71. Moon, K.H. and
R.G. Bunge: Observations on the biochemistry
of human semen.
II. Alkaline Phosphatase.
Fertil. Steril., 19, 766-770 (1968)
72. Nath, J.: Correlative biochemical and ultra-
structural studies on the mechanism
of freezing damage to ram semen.
Cryobiology, 9, 240-246 (1972)
73. Nun, S., I. Mu-
sacchio and
J.A. Epstein: Variations in seminal plasma con-
stituents from fertile, subfertile,
and vasectomized azoospermic men.
Fertil. Steril., 23, 357-360 (1972)
74. Oettlé, A.G.: zit. Schill, W.-B.:
Die Bedeutung der Proteasen des
männlichen Genitaltraktes für
die Fortpflanzung.
Med. Welt, 26, 1450-1453 (1975)
75. Pedersen, H.
and P.E. Lebech: Ultrastructural changes in the
human spermatozoon after freezing
for artificial insemination.
Fertil. Steril., 22, 125-133 (1971)

76. Perloff, W.H.,
E. Steinberger
and J.K. Sherman: Conception with human spermatozoa frozen by nitrogen vapor technic. *Fertil. Steril.*, 15, 501-504 (1964)
77. Polge, C.,
A. U. Smith
and A.S. Parkes: Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 164, 666-669 (1949)
78. Povoas, H. and
G.G. Villela: Transaminase in seminal plasma of man. *Experientia*, 16, 199-203 (1960)
79. Pumpinaski, R.
and A. Sharon: Transaminase activity of human semen: Correlation with sperm concentration. *Int. J. Fertil.*, 10, 253-256 (1965)
80. Raboch, J.,
L. Starka and
J. Neuwirth: Hormonal testicular activity in chromatinpositive men. *Endokrinologie*, 58, 425-431 (1971)
81. Rätz, K.H. und
A. Mattheus: Untersuchungen über die Beziehungen zwischen Transaminasekonzentrationen und anderen Parametern des Ejakulats. *Andrologie*, 4, 355-361 (1972)
82. Roussel, J.D. and
O.T. Stallcup: Parallelism between semen characteristics and glutamic-oxalacetic transaminase, glutamic-pyruvic transaminase activities. *J. Dairy Sci.*, 48, 1684-1687 (1965)
83. Ruskova, S.,
M. Hlebarova,
S. Danev and
V. Karakasheva: Biochemical and morphological studies of the semen from males with diseases of the reproductive system. *Andrologie*, 4, 17-24 (1972)
84. Sawada, Y.: Studies on the freezing preservation of human spermatozoa. *Jap. J. Fertil. Steril.* 4, 1-4 (1959)
85. Sawada, Y.,
D.R. Ackerman
and S.J. Behrman: Motility and respiration of human spermatozoa after cooling to various low temperatures. *Fertil. Steril.*, 18, 775-781 (1967)

86. Schill, W.-B.: Humane Spermakonservierung und therapeutische Ausblicke.
Der Hautarzt, 23, 525-530 (1972)
87. Schill, W.-B.: Acrosin activity in human spermatozoa: Methodological investigations.
Arch. Derm. Forsch. 248, 257-273 (1973)
88. Schill, W.-B.: Der Einfluß der kryobiologischen Behandlung von Humansperma auf die Aktivität der akrosomalen Protease Akrosin.
Andrologie, 5, 333-337 (1973)
89. Schill, W.-B.: Untersuchungen zur Aktivität von Humanakrosin unter den Bedingungen der Spermakonservierung.
Zuchthygiene, 9, 71 (1974)
90. Schill, W.-B.: Acrosin activity of cryo-preserved human spermatozoa.
Fertil. Steril., 26, 711-720 (1975)
91. Schill, W.-B.: Die Bedeutung der Proteasen des männlichen Genitaltraktes für die Fortpflanzung.
Med. Welt, 26, 1450-1453 (1975)
92. Schill, W.-B.
and H.H. Wolff: Acrosin activity and acrosome ultrastructure of human spermatozoa after freeze preservation.
Naturwissenschaften, 61, 172-174 (1974)
93. Schill, W.-B.
and H.H. Wolff: Ultrastructure of human sperm acrosome and determination of acrosin activity under conditions of semen preservation.
Int. J. Fertil., 19, 217-223 (1974)
94. Schirren, C.: Fertilitätsstörungen des Mannes.
Beiträge zur Sexualforschung.
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart 1961
95. Schirren, C.: Praktische Andrologie.
Verlag Brüder Hartmann, Berlin 1971

96. Schirren, C. und A. Eweis: Akrosinaktivität in menschlichen Spermatozoen und Spermatozoendichte im Ejakulat. Andrologie, 5, 81-83 (1973)
97. Schumacher, G.F.B. and L.J.D. Zaneveld: Proteinase inhibitors in human cervical mucus and their in vivo interaction with human acrosin. In: Bayer Symposium V. "Proteinase inhibitors", eds. Fritz, H., H. Tschesche, E.J. Greene, E. Truscheit. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1974
98. Scott, W.W. and C. Huggins: zit. Mann, T.: The biochemistry of semen and of the male reproductive tract. Methuen and Co. Ltd., London 1964
99. Sherman, J.K.: Freezing and freeze-drying of human spermatozoa. Fertil Steril., 2, 357-371 (1954)
100. Sherman, J.K.: Survival of higher animal cells after the formation and dissolution of intracellular ice. Anat. Rec. 144, 171-174 (1962)
101. Sherman, J.K.: Improved methods of preservation of human spermatozoa by freezing and freeze-drying. Fertil. Steril., 14, 49-64 (1963)
102. Sherman, J.K.: Questionable protection by intracellular glycerol during freezing and thawing. J. Cell. Comp. Physiol. 6, 167-170 (1963)
103. Sherman, J.K.: Comparison of in vitro and in situ ultrastructural cryoinjury and cryoprotection of mitochondria. Cryobiology, 9, 112-114 (1972)
104. Sherman, J.K.: Current perspectives: Synopsis of the use of frozen human semen since 1964: State of the art of human semen banking. Fertil. Steril., 24, 397-412 (1973)

105. Sherman, J.K.
and R.G. Bunge: Observations on preservation of human spermatozoa at low temperatures.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med.
82, 686-688 (1953)
106. Sherman, J.K.
and F. Char: Stability of Y-chromosome fluorescence during freeze-thawing and frozen storage of human spermatozoa.
Fertil. Steril., 25, 311-314 (1974)
107. Sherman, J.K.
and K.C. Liu: Ultrastructural cryoinjury and cryoprotection of rough endoplasmic reticulum.
Cryobiology, 10, 104-109 (1973)
108. Shettles, L.B.: The respiration of human spermatozoa and their response to various gases and low temperatures.
Amer. J. Physiol., 128, 408-411 (1940)
109. Sokol, K.: Vorrichtungen zum Einfrieren von Sperma.
Patentschrift und Patent, 1958
110. Spallanzani, L.: zit. Sherman, J.K.:
Current perspectives: Synopsis of the use of frozen human semen since 1964: State of the art of human semen banking.
Fertil. Steril., 24, 397-412 (1973)
111. Stambaugh, R.
and J. Buckley: Zona pellucida dissolution enzymes of the rabbit sperm head.
Science, 161, 585-586 (1968)
112. Stambaugh, R.
and J. Buckley: Comparative studies of the acrosomal enzymes of rabbit, rhesus monkey and human spermatozoa.
Biol. Reprod., 3, 275-282 (1970)
113. Student zit. Fisher, R.A.:
Statistical methods for research workers.
12. Auflage
Oliver and Boyd, Edinburgh 1954

114. Suominen, J. and M. Niemi: Proteolytic enzymes in human seminal fluid.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 25, Suppl. 113, 52 (1970)
115. Suominen, J. and M. Niemi: Influence of human seminal proteases on vascular permeability.
Nature (London) New Biol. 232, 90-91 (1971)
116. Swyer, G.I.M.: A tubal factor concerned in the denudation of rabbit ova.
Nature, 159, 873-874 (1947)
117. Tyler, E.T.: Report.
Med. Tribune, 6, 1-12 (1971)
118. Tyler, E.T.: The clinical use of frozen semen banks.
Fertil Steril., 24, 413-416 (1973).
119. Waldschmidt, M. H. Karg und B. Hoffmann: Proteolytische Aktivität in männlichen Geschlechtssekreten des Rindes.
Naturwissenschaften, 51, 18 (1964)
120. Withycombe W.A. and J.H. Wilkinson: Some properties of human spermatozoal lactate-dehydrogenase isoenzymes.
Biochem. J., 93, 11p-12p (1964)
121. Wroblewski, F. and J.S. LaDue: Lactic dehydrogenase activity in blood.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 90, 210-214 (1955)
122. Zaneveld, L.J.D., B.M. Dragoje and G.F.B. Schumacher: Acrosomal proteinase and proteinase inhibitor of human spermatozoa.
Science, 177, 702-703 (1972)
123. Zaneveld, L.J.D., G.F.B. Schumacher, P.F. Tauber and D. Propping: Proteinase inhibitors and proteinases of human semen.
In: Bayer Symposium V. "Proteinase inhibitors", eds. Fritz, H., H. Tschesche, L.J. Greene, E. Truscheit. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1974

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Dr. med. habil. W.-B.S c h i l l
danke ich besonders herzlich für die Überlassung des
Themas und seine Hilfe.

Fräulein I. E s t e l m a n n danke ich für die jeder-
zeit bereitwillig gewährte Unterstützung.

LEBENS LAUF

Am 2. Dezember 1940 wurde ich als Sohn des Ingenieurs Karl Hoffmann und seiner Ehefrau Elisabeth, geb. Siebert, in Riesa/Elbe geboren.

Nach 5 Volksschulklassen in Heiligenstadt im Eichsfeld und Randersacker bei Würzburg trat ich 1952 in das Realgymnasium für Jungen in Würzburg ein. Nach der mittleren Reife begann ich bei der Deutschen Bundespost ein zweijähriges Schlosserpraktikum zum Zwecke eines späteren Ingenieurstudiums. Im Herbst 1960 gab ich jedoch das Praktikum auf und besuchte die Carl-Schurz-Schule (Realgymnasium) in Frankfurt am Main, wohin unsere Familie verzogen war. März 1963 bestand ich dort das Abitur.

Von 1963 - 1965 diente ich in der Bundeswehr.

Im Wintersemester 1965/66 begann ich mit dem Studium der Veterinärmedizin an der Tierärztlichen Fakultät der Universität München, das ich mit Staatsexamen und Promotion abschloß.

Von 1971 bis 1975 studierte ich an der Universität München Humanmedizin. Nach dem Staatsexamen arbeitete ich an Krankenhäusern in Steingaden, Marktoberdorf und Landshut. Derzeit bin ich auf der Anästhesieabteilung des Stadtkrankenhauses in Kempten als Assistenzarzt beschäftigt.

Dissertations- und Fotodruck ANNELIESE SCHUBERT
Corneliusstraße 21 • 8000 München 5 • Telefon 268177

